

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



**EFFECTOS TERAPÉUTICOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE
HÍGADO (LGF) EN UN MODELO DE ENFISEMA EXPERIMENTAL
INDUCIDO POR LA EXPOSICIÓN CRÓNICA AL HUMO DE TABACO**

TESIS DOCTORAL

ÁLVARO GIRÓN MARTÍNEZ

MADRID, 2014

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**EFFECTOS TERAPÉUTICOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE
HÍGADO (LGF) EN UN MODELO DE ENFISEMA EXPERIMENTAL
INDUCIDO POR LA EXPOSICIÓN CRÓNICA AL HUMO DE TABACO**

TESIS DOCTORAL

**ÁLVARO GIRÓN MARTÍNEZ
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**DIRECTOR: Dr. GERMÁN PECES-BARBA ROMERO
Laboratorio de Neumología Experimental
Instituto de Investigación Sanitaria - Fundación Jiménez-Díaz
Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades
Respiratorias (CIBERES)**

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Dr. Germán Peces-Barba Romero y al resto de miembros del servicio de Neumología de la Fundación Jiménez-Díaz por ofrecerme la oportunidad de formar parte del laboratorio de Neumología. Sin su confianza, nada de esto hubiese sido posible.

Gracias al Dr. Juan Francisco Medina por abrirme las puertas de su laboratorio en Pamplona. A Hugo, Alex, Sarai, January, Fabián, Axel, Miriam y Elena por vuestro apoyo durante mis inicios en la ciencia y por los buenos ratos que pasé con vosotros durante mi etapa en Pamplona. Gracias en especial al Dr. Jesús Bañales al que admiro y del que aprendí que con esfuerzo y dedicación todo es posible.

Gracias a mis compañeras Sandra y Laura por su ayuda incondicional desde el primer día. Todo lo que he aprendido en estos 4 años se lo debo en gran parte a ellas. Gracias a mi compañero Raúl que a pesar de llegar más tarde, aportó muchísimo tanto en lo científico como en lo personal con su alegría y su simpatía. Gracias a “las Irenes” por ser algo más que las vecinas de al lado y por los grandes momentos vividos. Gracias a Jimena, Paola y Bernardo porque a pesar de compartir menos tiempo con ellos, guardo grandes recuerdos. Gracias al personal del animalario por su labor en el cuidado de los ratones, elemento fundamental en este trabajo. Y en general, gracias a todas aquellas personas de la Fundación Jiménez-Díaz que aunque no nombre, de algún modo han aportado su granito de arena.

Gracias a mis compañeros/as de carrera con los que compartí innumerables horas de estudio, de prácticas, de clases y también de cafetería. Los buenos y malos momentos que vivimos juntos me han ayudado a llegar hasta donde hoy me encuentro. Gracias a José, Patxi y Alberto por estar ahí siempre y gracias a Erick y a Edu, dos grandes amigos que a pesar de no tener ni idea de mi trabajo, siempre lo han valorado y apoyado.

Thanks to Dr. Martin Liu and Dr. Hesham Basma. Thanks to Lillian, Amy, Jun, Maki, Kumiko, Jannah, Joe and especially thanks to Dr. Stephen Rennard and his wonderful family for their hospitality during my stay in his laboratory in Omaha. I am a better researcher and a better person thanks to you.

Y sobre todo gracias a mi familia. De ellos he recibido la mejor educación que podía esperar. Siempre me han apoyado, acompañándome en cada uno de los pasos que he tenido que dar para llegar hasta aquí. Gracias sobre todo a Lara por estar ahí desde el principio, desde siempre, mucho antes de sentir interés por la biología, la ciencia y la investigación. Nunca me ha fallado y por ello estaré eternamente agradecido.

Por último, quiero dar las gracias a mis abuelos, a los que están y a los que no. Por su amor, su cariño y por ser siempre los primeros en interesarse por mi trabajo y mi futuro. Y en especial a mi abuelo que siempre me decía “tú tienes que ser investigador”. Yo me conformo con ser como tú.

RESUMEN

El desarrollo de enfisema es un aspecto característico de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), siendo el humo de tabaco el principal factor de riesgo. Actualmente, el tratamiento de la EPOC consiste en la administración de broncodilatadores y corticoesteroides para controlar la función pulmonar, los síntomas y las exacerbaciones, pero no existen terapias efectivas dirigidas a revertir la progresión de la enfermedad. El factor de crecimiento de hígado (LGF) es un complejo albúmina-bilirrubina con propiedades mitogénicas, cuyos efectos terapéuticos han sido previamente descritos en otros modelos animales de enfermedades como Parkinson, daño hepático, degeneración testicular, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares o hipertensión. Para evaluar los efectos del LGF en un modelo de enfisema, analizamos parámetros morfométricos y funcionales a nivel pulmonar, así como la actividad metaloproteásica y diversos marcadores de daño y de reparación tisular como VEGF, PCNA, 3-NT y Nrf2 en ratones C57BL6/j expuestos de forma crónica al humo de tabaco y tratados posteriormente con una dosis adecuada de LGF por vía intraperitoneal. Los ratones expuestos al humo de tabaco presentaron un agrandamiento significativo de los espacios alveolares (Lm), mayor área interna alveolar (AIA) y pérdida de función pulmonar que correlacionó con una mayor actividad metaloproteásica, un incremento de la expresión de 3-NT y un descenso de la expresión de VEGF. Por el contrario, aquellos ratones expuestos al humo de tabaco y tratados posteriormente con LGF mostraron una mejoría del daño pulmonar así como síntomas de recuperación de función pulmonar que correlacionó con una menor actividad metaloproteásica, un descenso en la expresión de 3-NT y un incremento en la expresión de VEGF, PCNA y Nrf2. Por lo tanto, este estudio aporta evidencias de que el LGF presenta efectos terapéuticos en un modelo de enfisema previamente establecido, postulándose como una estrategia prometedora para revertir la progresión de la EPOC en un futuro.

SUMMARY

Emphysema is a major component of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), considering cigarette smoke (CS) as the main risk factor. Currently, treatment of COPD is based on the administration of bronchodilators and corticosteroids to control the lung function, the symptoms and exacerbations, but there are no effective therapies directed to reverse the progression of the disease. Liver growth factor (LGF) is an albumin-bilirubin complex with mitogenic properties, whose therapeutic effects has been previously reported in several rodent models such as injured liver, Parkinson's disease, testis degeneration, atherosclerosis, heart or hypertension. To address the therapeutic effect of LGF, morphometric and lung function parameters, matrix metalloproteinase (MMP) activity and the expression of several markers such as VEGF, PCNA, 3-NT and Nrf2 were assessed in air-exposed and CS-exposed C57BL/6j male mice with and without intraperitoneal (*i.p.*) injection of LGF administered after long-term cigarette smoke exposure (CSE). CS-exposed mice presented a significant enlargement of alveolar spaces (Lm), higher alveolar internal area (AIA) and loss of lung function that correlated with higher MMP activity, higher expression of 3-NT and lower expression of VEGF. CS-exposed mice and then *i.p.* injected with LGF, showed an amelioration of emphysema and improved lung function that correlated with lower MMP activity and 3-NT expression, and higher levels of VEGF, PCNA and Nrf2. Thus, this study provides evidence that LGF administration produced therapeutic effects once the lung damage was established, postulated as a promising strategy to revert the progression of COPD in the future.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	1
INTRODUCCIÓN.....	5
1. INTRODUCCIÓN A LA EPOC.....	6
2. SITUACIÓN ACTUAL DE LA EPOC.....	7
3. FACTORES DE RIESGO.....	8
4. FISIOPATOLOGÍA DE LA EPOC.....	9
4.1. Respuesta inflamatoria.....	10
4.2. Estrés oxidativo.....	11
4.3. Desequilibrio proteasa-antiproteasa.....	12
4.4. Apoptosis.....	14
5. FENÓMENOS DE REPARACIÓN EN RESPUESTA AL DAÑO DEL EPITELIO ALVEOLAR	16
6. TERAPIAS CONTRA EL DESARROLLO DE ENFISEMA.....	19
7. FACTOR DE CRECIMIENTO DE HÍGADO: LGF.....	20
8. MODELOS ANIMALES POR EXPOSICIÓN AL HUMO DE TABACO.....	21
OBJETIVOS.....	24
MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
1. MODELO ANIMAL DE ENFISEMA.....	27
1.1. Animales de experimentación.....	27
1.2. Desarrollo del modelo de enfisema.....	27
1.3. Modo de exposición al humo de tabaco.....	28
2. ADMINISTRACIÓN DEL LGF.....	29
3. TÉCNICA DE IMAGEN MOLECULAR DE FLUORESCENCIA <i>in vivo</i>	30
4. ESTIMACIÓN DE LA FUNCIÓN PULMONAR.....	31
5. TEJIDO PULMONAR.....	32
5.1. Extracción del bloque pulmonar.....	32
5.2. Análisis morfométrico.....	32

5.3. Inmunohistoquímica para la detección de células positivas para PCNA.....	33
6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS DE TEJIDO PULMONAR.....	34
6.1. Cuantificación de proteínas.....	34
6.2. Western-blot.....	34
7. EXTRACCIÓN DE ARN, RETROTRANSCRIPCIÓN Y PCR EN TIEMPO REAL.....	36
7.1. Extracción de ARN.....	36
7.2. Retrotranscripción (RT).....	36
7.3. PCR en tiempo real (PCRq).....	37
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	37
RESULTADOS.....	39
1. CONFIRMACIÓN DEL MODELO DE ENFISEMA.....	40
2. EL LGF REDUCE EL DAÑO INDUCIDO POR HUMO DE TABACO.....	41
3. MEJORA DEL DAÑO PULMONAR CORRELACIONA CON UN DESCENSO DE LA ACTIVIDAD DE LAS MMPs.....	42
4. DESEQUILIBRIO PROTEASA-ANTIPROTEASA.....	44
5. EL DESCENSO DE LA ACTIVIDAD DE LAS MMPs CORRELACIONA CON UN DESCENSO EN LOS NIVELES DE MMP-12.....	45
6. EFECTO PROLIFERATIVO DEL LGF SOBRE EL EPITELIO ALVEOLAR.....	46
7. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON LGF SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO.....	48
DISCUSIÓN.....	50
1. MODELO DE ENFISEMA PULMONAR.....	52
2. RECUPERACIÓN DEL DAÑO PULMONAR.....	53
3. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL LGF.....	53
3.1. Balance proteasa-antiproteasa.....	53
3.2. Apoptosis y proliferación.....	55
3.3. Estrés oxidativo.....	56
4. LIMITACIONES.....	58

CONCLUSIONES.....	60
BIBLIOGRAFÍA.....	62
PUBLICACIONES.....	76

Abreviaturas

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. Algunas se han mantenido en su formato y definición en inglés debido a su frecuente uso en el lenguaje científico.

3-NT	3-nitrotirosina
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	Ácido desoxiribonucleico copia
AIA	Área interna alveolar
AP-1	Proteína activadora 1 (<i>Activator protein 1</i>)
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BCA	Ácido bicinconínico
BMP	Proteína morfogénica ósea (<i>Bone Morphogenetic Protein</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
Ca ²⁺	Calcio
CCD	<i>Charged coupled device</i>
CD	Complejo de diferenciación (<i>Cluster of differentiation</i>)
COHb	Carboxi-hemoglobina
EEM	Error estándar de la media
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (<i>Epidermal growth factor</i>)
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (<i>Fibroblast growth factor</i>)
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GOLD	<i>Global initiative for chronic obstructive lung disease</i>
H ₂ O	Agua
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos (<i>Hepatocyte growth factor</i>)
IGF	Factor de crecimiento insulínico (<i>Insulin-like growth factor</i>)
IIS	Instituto de investigaciones sanitarias
KGF	Factor de crecimiento de queratinocitos (<i>Keratinocyte growth factor</i>)
LGF	Factor de crecimiento de hígado (<i>Liver growth factor</i>)
Lm	Distancia media entre las paredes alveolares

LPS	Lipopolisacárido
MMP	metaloproteasa de matriz (<i>Matrix metalloproteinase</i>)
NAC	N-acetilcisteína
NaCl	Cloruro sódico
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NO	Óxido nítrico
Nrf2	<i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
O ₂ ⁻	Anión superóxido
OMS	Organización mundial de la salud
ONOO ⁻	Anión peroxinitrito
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación (<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>)
PCRq	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (<i>Quantitative polymerase Chain Reaction</i>)
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (<i>Platelet-derived growth factor</i>)
PVDF	Polifluoruro de vinilideno (<i>Polyvinylidene difluoride</i>)
RNS	Especies reactivas de nitrógeno (<i>Reactive nitrogen species</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive oxygen species</i>)
S1P	Esingosina-1-fosfato (<i>Sphingosine-1-phosphate</i>)
SDRA	Síndrome de distrés respiratorio agudo
sGC	Guanilato ciclasa soluble (<i>soluble guanylate cylcase</i>)
SHH	<i>Sonic hedgehog protein</i>
TBS	Tampón tris-salino (<i>Tris buffered saline</i>)
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β (<i>Transforming growth factor β</i>)
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteasas (<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa (<i>Tumor necrosis factor alpha</i>)

VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular (Vascular endothelial growth factor)
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento de endotelio vascular
V _{max}	Volumen máximo a 30 mbares
Zn ²⁺	Zinc

Introducción

1. INTRODUCCIÓN A LA EPOC

“Voluminosos” o “turgentes” fueron términos que Bonet y Morgagni emplearon respectivamente para describir el aspecto de los pulmones en personas con problemas respiratorios (99). Años después, Ruysch describió e ilustró con imágenes el agrandamiento de los espacios alveolares, y un siglo después fue Baillie quién postuló el carácter destructivo de lo que hoy se define como enfisema (137). Haciendo referencia a sus orígenes griegos, la palabra enfisema podría traducirse como “aire dentro” o “insuflación”. En términos fisiológicos, se refiere al fenómeno de carácter destructivo que impide exhalar por completo el aire previamente inhalado debido a la pérdida de flexibilidad del tejido pulmonar.

Desde aquellas primeras descripciones, han transcurrido 200 años de innumerables estudios que han ayudado a la comunidad científica a establecer lo que hoy conocemos como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la cual se define como una enfermedad evitable y tratable, con afectación sistémica, que se caracteriza por una limitación progresiva y a veces persistente del flujo aéreo asociada a una respuesta crónica inflamatoria en las vías aéreas y en el pulmón frente a partículas o gases nocivos.

Esta definición forma parte de un informe redactado por un comité de científicos expertos, dentro del marco de la iniciativa global para la EPOC (GOLD, de sus siglas en inglés). Esta iniciativa fue propuesta por la comunidad científica en 1998, ante la necesidad de controlar una enfermedad a menudo subestimada en comparación con otras patologías como el cáncer o las enfermedades cardiovasculares, y para advertir tanto a la población como a los organismos de gobierno y salud pública sobre la gravedad de la enfermedad y ofrecer a su vez ciertas pautas, directrices y recomendaciones con el fin de mejorar tanto la gestión como la prevención de la EPOC.

2. SITUACIÓN ACTUAL DE LA EPOC

Según la Organización mundial de la Salud (OMS) en estimaciones del 2007, alrededor de 210 millones de personas sufren las consecuencias de la EPOC. En el año 2005, 3 millones de personas murieron a causa de esta enfermedad (5% de las muertes en todo el mundo). La EPOC es más frecuente en fumadores y ex fumadores, en personas de más de 40 años, y más frecuente en hombres que en mujeres. Otros datos publicados por la OMS establecen que la EPOC será la causante, en el año 2020, del 27% de las muertes asociadas al consumo de tabaco solo superada por el cáncer y enfermedades cardiovasculares. De hecho, en 1990 la EPOC era la sexta causa de muerte en el mundo y se prevé que para el año 2030 alcance la tercera posición (83).

Si nos centramos en España, se estima que cada año mueren más de 18.000 personas por EPOC. Los datos epidemiológicos revelan que la EPOC en España supone la quinta causa de muerte entre los varones, y la séptima para las mujeres. Entre los 19 países europeos con datos disponibles, España se sitúa en la octava posición en cuanto a mortalidad por EPOC en varones y de las más bajas en mujeres (122). El estudio epidemiológico más reciente sobre la EPOC en territorio español (EPI-SCAN) sostiene que la prevalencia actual de la EPOC en España, según los criterios GOLD, es del 10,2% de la población de 40 a 80 años. Anteriormente el estudio IBERPOC, realizado en 1997 y en un rango diferente de edad que iba de 40 a 70 años, determinó una prevalencia de EPOC del 9,1% (14,3% en hombres y 3,9% en mujeres), definida según los criterios antiguos de la *European Respiratory Society* (123).

Sin embargo, históricamente los estudios epidemiológicos sobre la EPOC han sido escasos y a menudo imprecisos debido a diferencias en los métodos de recopilación de datos, en los métodos de diagnóstico o en el enfoque analítico (51). Hasta 2001, sólo se habían realizado 32 estudios de prevalencia de EPOC a escala mundial. Por otro lado en Europa, hasta 2006 la EPOC y otras enfermedades respiratorias no eran consideradas como enfermedades prioritarias dentro del ámbito

sanitario de la Unión Europea (122). En España, el estudio IBERPOC estimó que dentro de la población de 40 a 69 años con EPOC, alrededor de un 75% no habían sido diagnosticados. Del mismo modo, el estudio EPI-SCAN llega a la conclusión de que en España existe un infradiagnóstico y por lo tanto un infratratamiento de la enfermedad. En este contexto, a pesar de su enorme magnitud comparable con la del cáncer o las enfermedades cardiovasculares, la EPOC se sitúa como una enfermedad de bajo impacto en la opinión pública y con recursos insuficientes para asistencia e investigación, generándose además una sensación de desinterés y despreocupación para afrontar el problema (87).

Ante este estado de alarma, la comunidad científica en las últimas décadas, ha advertido a los organismos de gobierno la necesidad de tomar medidas. Ejemplo de ello es la iniciativa GOLD nombrada anteriormente. En Europa, las sociedades científicas neumológicas han llevado a cabo, en los últimos años, una intensa labor de difusión sobre la realidad de las enfermedades respiratorias obteniendo como resultado el reconocimiento de estas patologías como prioritarias en la investigación biomédica europea. Del mismo modo en España, el Sistema Nacional de Salud, publicó en 2009 la estrategia en EPOC con el objetivo de identificar posibles carencias y deficiencias de la organización asistencial y establecer objetivos y recomendaciones de mejora. Además, las sociedades científicas españolas han promovido una guía española conjunta denominada “Guía española de la EPOC” (88).

3. FACTORES DE RIESGO DE LA EPOC

La EPOC es una enfermedad compleja y su desarrollo depende de diversos factores. El más importante es la exposición al humo de tabaco dado que el 90% de las personas diagnosticadas con EPOC son o han sido fumadores. En este contexto, se estima que la prevalencia de la enfermedad aumentará con el paso de los años debido a que en la actualidad, el número de personas que fuman es mayor que en cualquier otro momento de la historia (83). Sin embargo, solo alrededor de un 20% de las

personas fumadoras desarrollan EPOC. Este dato apunta a que existen otros factores, tanto genéticos como ambientales, implicados en el desarrollo de esta enfermedad:

- **Exposición pasiva al humo de tabaco:** Se ha demostrado que las personas más expuestas al humo de tabaco en su entorno laboral o en el hogar tienen mayor probabilidad de desarrollar EPOC (2).
- **Exposición a otros gases tóxicos:** Los trabajadores expuestos continuamente a determinados gases derivados de las actividades realizadas en granjas, explotaciones mineras, industria textil, industria química, etc., tienen mayor riesgo de desarrollar EPOC. Lo mismo ocurre en personas que han vivido en ciudades con alta contaminación ambiental.
- **Actividad física:** Estudios experimentales describen que existe una mejor respuesta antiinflamatoria derivada de la práctica de ejercicio físico de forma regular.
- **Infecciones respiratorias:** Existe relación entre las infecciones virales en el tracto respiratorio durante los primeros años de vida y el desarrollo de EPOC durante la edad adulta.
- **Factores genéticos:** Los polimorfismos o alteraciones genéticas presentes en cada individuo, determinarán la expresión de proteínas implicadas en procesos como reparación de matriz extracelular (MMPs, α_1 -antitripsina) respuesta inflamatoria o respuesta antioxidante. Esto puede suponer mayor predisposición a desarrollar la enfermedad.

4. FISIOPATOLOGÍA DE LA EPOC

La EPOC se caracteriza por una limitación al flujo aéreo ocasionada por el engrosamiento de las paredes de las vías aéreas y por la destrucción del parénquima

alveolar y agrandamiento de los espacios alveolares que dan lugar al enfisema. Estas alteraciones aparecen debido a la activación de diversos mecanismos destructivos y relacionados entre sí (Figura 1):

4.1 Respuesta inflamatoria

Se inicia como respuesta al daño causado por el humo de tabaco sobre el tejido pulmonar (22). La exposición a los miles de compuestos tóxicos y especies reactivas de oxígeno (ROS) presentes en el humo de tabaco (142), puede suponer un aumento del estrés oxidativo y muerte celular. Como consecuencia, se liberan al entorno moléculas y restos celulares que actúan como indicadores de daño a nivel local (84), activando la respuesta inmune innata. Esta respuesta estimula la liberación de mediadores de inflamación (citoquinas y quimioquinas) que favorecen el reclutamiento y activación de macrófagos y neutrófilos que, a su vez, secretan más mediadores de inflamación y enzimas proteolíticas (MMPs, elastasa neutrofílica) contribuyendo más aun al daño pulmonar.

Si la exposición al humo de tabaco es continuada en el tiempo, el estímulo que desencadena el daño no desaparece. En este sentido, tanto la respuesta inflamatoria como los fenómenos de muerte celular y destrucción de matriz extracelular irán siendo cada vez más intensos, liberándose al medio autoantígenos, proteínas modificadas y restos de ADN procedentes de células muertas capaces de activar la respuesta inmune adaptativa al ser reconocidos por las células dendríticas y macrófagos (66). Ambos tipos celulares actúan como células presentadoras de antígeno migrando hasta los nódulos linfáticos para activar a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Una vez activados, los linfocitos T pueden viajar por el torrente sanguíneo hasta infiltrarse en el tejido dañado donde liberarán más mediadores de inflamación y enzimas proteolíticas (perforina, granzima A y B, granzulina) contribuyendo a la destrucción del parénquima pulmonar. En estudios previos se ha descrito que en personas con EPOC, el número de linfocitos T CD8⁺ infiltrados en el tejido pulmonar se correlaciona con el grado de

obstrucción al flujo aéreo y el grado de enfisema (118). Además, en pulmones de fumadores con EPOC y enfisema, el número de células epiteliales y endoteliales que sufren apoptosis, correlaciona con la duración del hábito tabáquico y con el número de linfocitos T CD8⁺ presentes en el pulmón (75). En el caso de los linfocitos T CD4⁺, en fumadores con EPOC también se ha observado un aumento del infiltrado celular tanto en vías aéreas como en parénquima pulmonar (54, 111).

Por otro lado, se ha demostrado la presencia de linfocitos B en el parénquima pulmonar en personas con enfisema (132). La causa por la que los linfocitos B participan en el desarrollo de la EPOC no está del todo clara, pero se piensa que puede deberse a una respuesta frente a antígenos microbianos, a antígenos presentes en el humo de tabaco (6), o a autoantígenos derivados de la destrucción del tejido y matriz extracelular (100, 119).

4.2 Estrés oxidativo

Cuando la respuesta antioxidante es incapaz de anular la acción de los agentes oxidantes presentes en el humo de tabaco, aumenta el daño por estrés oxidativo. Los macrófagos y neutrófilos activados durante el proceso inflamatorio, también contribuyen a la liberación endógena de ROS (105). A nivel molecular, la presencia de ROS y radicales libres puede iniciar una respuesta inflamatoria mediante la activación de factores de transcripción como NF- κ B o AP-1, los cuales favorecen la expresión de genes pro-inflamatorios (106). Las ROS también pueden inducir peroxidación de lípidos, alterando así la integridad de la membrana celular y la expresión de receptores. Por otro lado, la interacción entre el peroxinitrito (ONOO⁻) y la tirosina de las proteínas da lugar a un producto estable que es la 3-nitrotirosina (3-NT), alterando la función de proteínas (65). Otros procesos afectados por la acción de agentes oxidantes son el remodelado de vasos sanguíneos y matriz extracelular, fenómenos de apoptosis, la secreción de mucus o fenómenos de proliferación celular (104).

Tanto las vías aéreas como los espacios alveolares están continuamente expuestos a agentes oxidantes externos, de modo que la respuesta antioxidante debe ser eficaz. El factor de transcripción Nrf2 juega un papel importante en la activación de la respuesta antioxidante dado que es capaz de inducir la expresión de una gran variedad de genes implicados en la respuesta frente al estrés oxidativo (11, 64). En situaciones patológicas como la EPOC, esos mecanismos de defensa no funcionan correctamente. En este sentido, en modelos de ratones Nrf2^{-/-} expuestos al humo de tabaco, se ha descrito una mayor respuesta inflamatoria (26, 58), así como un mayor número de células apoptóticas (107) proponiendo que Nrf2 no solo participa en la respuesta antioxidante, sino que también tiene un rol importante en mecanismos dirigidos a frenar la respuesta inflamatoria.

4.3 Desequilibrio proteasa-antiproteasa

La matriz extracelular está constituida por un entramado de proteínas y glicoproteínas entre las que se incluyen elastina, laminina, fibronectina, diversos tipos de colágeno, heparina y proteoglicanos cuya función principal es ofrecer soporte y anclaje tanto a células como a vasos sanguíneos (28). Las proteasas de matriz (MMPs, NE) son enzimas proteolíticas capaces de degradar componentes de la matriz extracelular. En condiciones fisiológicas normales, esta actividad proteásica es regulada por inhibidores de proteasas (TIMPs, α_1 -antitripsina), de modo que tanto las proteasas como sus inhibidores actúan de forma coordinada en procesos de renovación y mantenimiento de la matriz extracelular. Sin embargo, si este equilibrio se ve alterado, puede haber un exceso de degradación de matriz extracelular. La evidencia más extendida respecto al desequilibrio proteasa-antiproteasa es el hecho de que las personas con deficiencia en la expresión de α_1 -antitripsina (inhibidor de elastasa neutrofílica), tienen mayor susceptibilidad a desarrollar enfisema de forma prematura (24, 68). En el contexto de la EPOC, la respuesta inflamatoria provocada inicialmente por la acción dañina del humo del tabaco, favorece la activación de los macrófagos alveolares y el reclutamiento de neutrófilos, los cuales liberan al medio

proteínasa-3, MMPs, NE y catepsinas que participan activamente en la degradación de componentes de matriz extracelular. Los fragmentos de elastina y los péptidos derivados de la degradación del colágeno, junto con otros restos de matriz, pueden actuar como quimioatrayentes de monocitos circulantes, neutrófilos y más macrófagos perpetuando así la respuesta inflamatoria y la destrucción del parénquima pulmonar (43, 61).

De todas las proteasas capaces de degradar la matriz extracelular, las metaloproteasas de matriz (MMPs) en particular, han sido ampliamente estudiadas debido a su relevante participación en el desarrollo de enfisema. Pertenecen a la familia de endopeptidasas dependientes de Zn^{2+} y Ca^{2+} y en la actualidad se conocen 24 tipos diferentes agrupadas en 6 categorías en base a criterios funcionales y estructurales: colagenasas, gelatinasas, estromielinasas, metaloproteasas de matriz asociadas a membrana, elastasas y matrilisinas (13). Inicialmente, las MMPs son secretadas en forma de pro-enzimas inactivas y son activadas posteriormente en el espacio extracelular mediante una cascada proteolítica que se puede iniciar por otras MMPs previamente activadas o por otras serin-proteasas. Los TIMPs son los principales inhibidores de las MMPs y como tales controlan su actividad catalítica. Por lo tanto, mantener el equilibrio fisiológico entre las MMPs y los TIMPs es esencial para el mantenimiento de la matriz extracelular. Las MMPs se caracterizan por degradar la matriz extracelular, sin embargo también se ha demostrado que pueden actuar sobre otros componentes como por ejemplo algunas quimioquinas, factores de crecimiento y receptores, lo que indica que además de tener una función importante en el remodelado, tienen una función reguladora en la respuesta inflamatoria (134).

En personas con EPOC se ha descrito que existe una sobreexpresión de MMP-2 y MMP-9 (42, 55, 113). Ambas pertenecen a la categoría de las gelatinasas, las cuales pueden degradar la gelatina, e incluso otros componentes de matriz como colágeno, elastina o fibronectina. En situaciones patológicas pueden ser secretadas por diversos tipos celulares como macrófagos, monocitos, neutrófilos y células epiteliales (25). Sus inhibidores específicos son TIMP-1 y TIMP-2, cuya expresión se ha visto disminuida en personas con enfisema (85).

En cuanto a la MMP-12, conocida también como metaloelastasa o elastasa macrofágica, se han realizado diversos estudios con animales en los que se ha demostrado la posible implicación de la MMP-12 en el desarrollo de enfisema (52). En personas con EPOC parece ser que la participación de la MMP-12 en el desarrollo de enfisema no es tan determinante como en modelos animales. Sin embargo, se ha visto que en el lavado broncoalveolar de personas diagnosticadas con EPOC existe más infiltración de macrófagos alveolares y que los niveles de MMP-12 son más elevados tanto en BAL como en tejido, en comparación con individuos sin EPOC (89).

4.4 Apoptosis

La hipótesis más aceptada para explicar los fenómenos de destrucción que dan lugar al enfisema, establece que la respuesta inflamatoria originada por la acción del humo de tabaco favorece la llegada a los pulmones de macrófagos y neutrófilos, los cuales secretan sus proteasas al medio extracelular contribuyendo al desequilibrio proteasa-antiproteasa y por tanto a la destrucción de matriz y células alveolares. Sin embargo, hay casos en los que personas fumadoras con enfermedad pulmonar (neumonía o SDRA) y una carga inflamatoria importante, no desarrollan enfisema. Esto demuestra que la patogénesis del enfisema pulmonar continúa siendo un enigma (63).

Recientemente y basándose en las observaciones de Liebow quien describió que en cortes histológicos de pulmones con enfisema las paredes o septos alveolares eran extremadamente finos y prácticamente sin vascularización (71), se han llevado a cabo diversos estudios bajo la hipótesis de que el enfisema se origina debido a la muerte por apoptosis de células endoteliales y epiteliales ligada a la destrucción de matriz extracelular (3, 16, 141).

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), es una molécula angiogénica implicada en procesos de proliferación y migración endotelial y se

encuentra en grandes cantidades en los pulmones siendo muy importante en el mantenimiento del endotelio. En cuanto a su implicación en el desarrollo de enfisema, se ha demostrado que tanto los niveles de VEGF como de su receptor (VEGFR2) están disminuidos en el tejido pulmonar de individuos con enfisema en comparación con individuos sanos y ese descenso correlaciona con un incremento de fenómenos apoptóticos en células alveolares (62, 80). En estudios con animales, se observó que al inducir el bloqueo del receptor de VEGF en ratas, éstas desarrollaban enfisema y presentaban también mayor estrés oxidativo en los pulmones (63, 130), sugiriendo que un descenso de la señalización de VEGF puede dar lugar a apoptosis. La red capilar es imprescindible para el mantenimiento y la supervivencia del epitelio que constituye las paredes alveolares, cuyas células son a su vez las responsables de la síntesis y liberación de VEGF (91). Por lo tanto, se crea un círculo vicioso que da lugar a la muerte de células epiteliales y alveolares por apoptosis contribuyendo al desarrollo de enfisema.

En definitiva, en personas con EPOC, el humo de tabaco provoca la activación de una respuesta inmune descontrolada, que no cesa incluso después de abandonar el hábito tabáquico. En este contexto, el aumento del estrés oxidativo debido a un mal funcionamiento de la respuesta antioxidante y la acción descontrolada de las proteasas, dan lugar a fenómenos de destrucción de matriz extracelular, apoptosis y desarrollo de enfisema, con la consecuente pérdida de función pulmonar llegando a ocasionar la muerte.

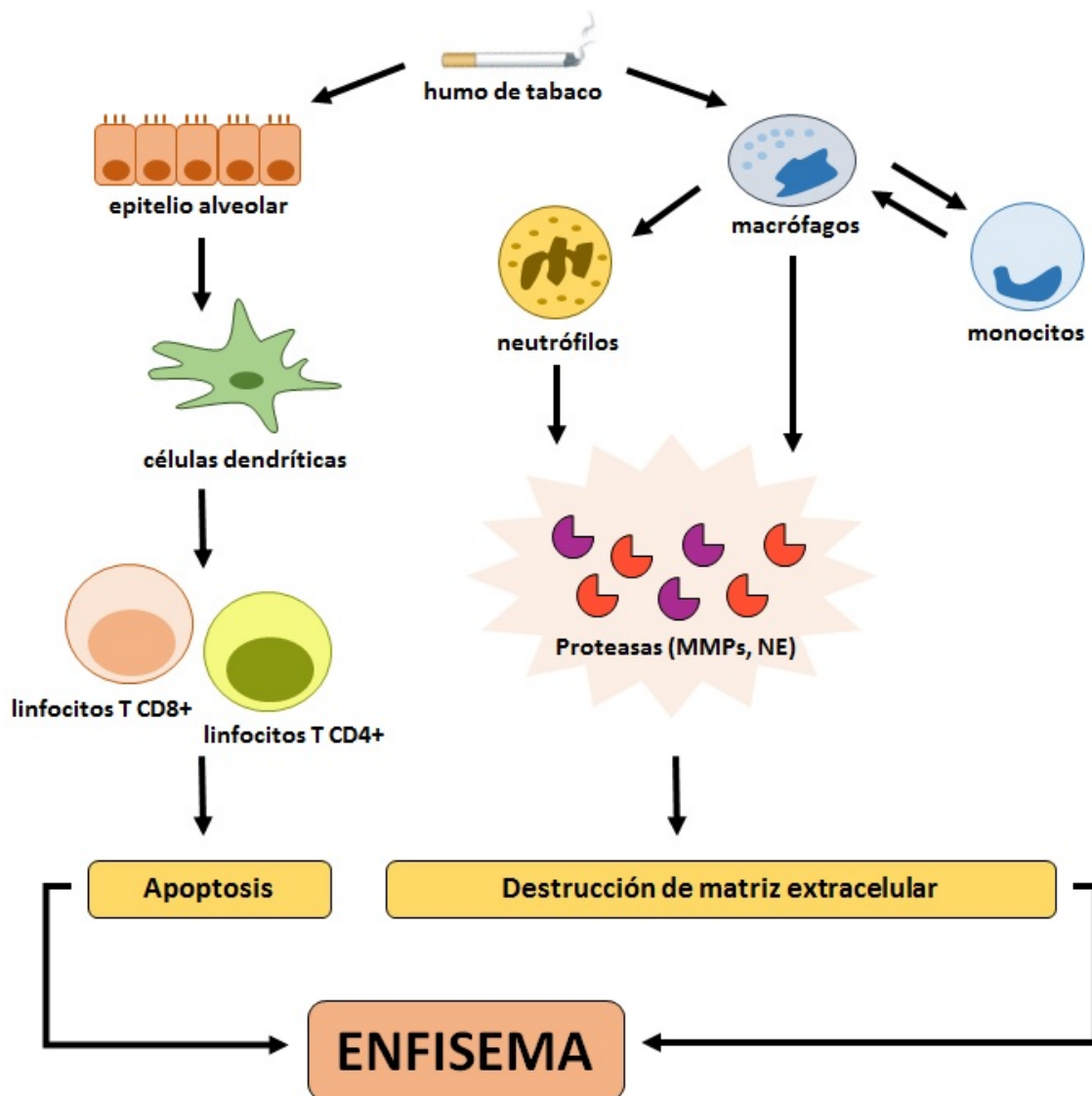


Figura 1. - Representación esquemática de los mecanismos patogénicos que dan lugar al desarrollo de enfisema.

5. FENÓMENOS DE REPARACIÓN EN RESPUESTA AL DAÑO DEL EPITELIO ALVEOLAR

Como respuesta al daño causado a nivel alveolar, diversos mediadores solubles son liberados al exterior por parte de fibroblastos, macrófagos, células endoteliales y epiteliales dañadas, entre los que se incluyen citoquinas, quimioquinas, interleucinas,

prostaglandinas, componentes de matriz y factores de crecimiento, siendo éstos últimos muy importantes en los fenómenos de reparación (23).

La función principal de los factores de crecimiento es promover la proliferación celular mediante la regulación de mecanismos de supervivencia, migración y diferenciación celular y de apoptosis. Mientras que en la fase embrionaria y en las primeras etapas del recién nacido los factores de crecimiento regulan procesos implicados en el correcto desarrollo del feto y en la organogénesis, en la etapa adulta intervienen en procesos relacionados con la reparación y renovación de tejidos que han sido previamente dañados a causa de enfermedades, infecciones, heridas traumáticas, envejecimiento celular, etc.

Como norma general, las rutas de señalización activadas por la unión de factores de crecimiento a receptores de la categoría tirosina quinasa (EGF, FGF, VEGF, PDGF) promueven la activación de procesos de proliferación y diferenciación celular, mientras que las rutas de señalización activadas por la unión de factores de crecimiento a receptores de la categoría serina/treonina quinasa (familia TGF- β , BMP-4) tienden a lo contrario. De este modo en los pulmones del individuo adulto, ambos mecanismos de señalización se mantienen en equilibrio para preservar tanto la estructura como la función pulmonar (17, 136). En los pulmones, se han descrito diversos factores de crecimiento que son relevantes para el mantenimiento de la homeostasis pulmonar (tabla 1), de modo que la alteración de la expresión o de la actividad de algunos de estos factores de crecimiento puede asociarse a diversas patologías. Por ejemplo, en cultivos de fibroblastos aislados de personas con EPOC, se demostró que la producción de HGF está disminuida (102) y en fumadores se ha observado que el grado de obstrucción al flujo aéreo está correlacionado con niveles más bajos de ARNm de HGF en tejido pulmonar (9). En este aspecto, la alteración de la producción de HGF en los fibroblastos puede contribuir al desarrollo de enfisema al favorecer fenómenos de apoptosis en células endoteliales y epiteliales. Respecto a VEGF, también se comprobó que en personas con enfisema, la expresión de VEGF y de su receptor VEGFR2 estaba disminuida y coincidía con un aumento de fenómenos apoptóticos en el epitelio alveolar (62, 80). Del mismo modo, los ratones PDGFA^{-/-}

desarrollan enfisema espontáneamente por la muerte de miofibroblastos alveolares responsables de la síntesis de elastina y de la formación de los septos alveolares (10, 72).

Tabla 1. Factores de crecimiento relevantes para el mantenimiento de la homeostasis pulmonar

TGF-α, EGF, FGF	Proliferación y diferenciación epitelial de las vías aéreas
TGF-β	Síntesis de matriz, diferenciación de neumocitos tipo 1 y tipo 2, formación de espacios alveolares
SHH	Diferenciación de las células del musculo liso de las paredes de las vías aéreas
BMP	Ramificación de las vías aéreas, formación de los espacios alveolares
PDGFA	Diferenciación de miofibroblastos alveolares
PDGFB	Proliferación de células mesenquimales
IGF	Desarrollo de vasos sanguíneos
GM-CSF	Diferenciación de macrófagos
VEGF	Angiogénesis y vasculogénesis. Diferenciación de neumocitos tipo 2 para la secreción de surfactante
HGF, KGF	Mitogénesis, proliferación y migración de neumocitos tipo 2

Modificado de (23, 29, 125)

En condiciones normales, el epitelio pulmonar es la primera barrera de defensa frente a las partículas nocivas que componen el humo del tabaco. Sin embargo, en personas con EPOC, esta barrera queda seriamente dañada dando lugar a un remodelado epitelial aberrante con la consecuente pérdida de funcionalidad. El epitelio alveolar está compuesto por dos poblaciones celulares diferentes por su morfología y fisiología (Figura 2). Los neumocitos tipo 1 son células planas y de aspecto laminar, las cuales constituyen alrededor del 90-95% de la superficie para el intercambio gaseoso, mientras que los neumocitos tipo 2 son células cuboidales encargadas de sintetizar y secretar el surfactante que recubre y protege el epitelio alveolar y que fueron descritas por Mason y Williams (81) como las “defensoras del

alvéolo". Esta definición se debe a que los neumocitos tipo 2 son considerados los progenitores del epitelio alveolar con capacidad de diferenciarse a neumocitos tipo 1 en respuesta a un daño epitelial (39, 108, 135), de modo que siguiendo esta línea, han sido muchos los estudios que han resaltado el papel importante de los neumocitos tipo 2 en procesos de reparación (7, 38, 56, 70, 73, 95, 108, 115, 135).

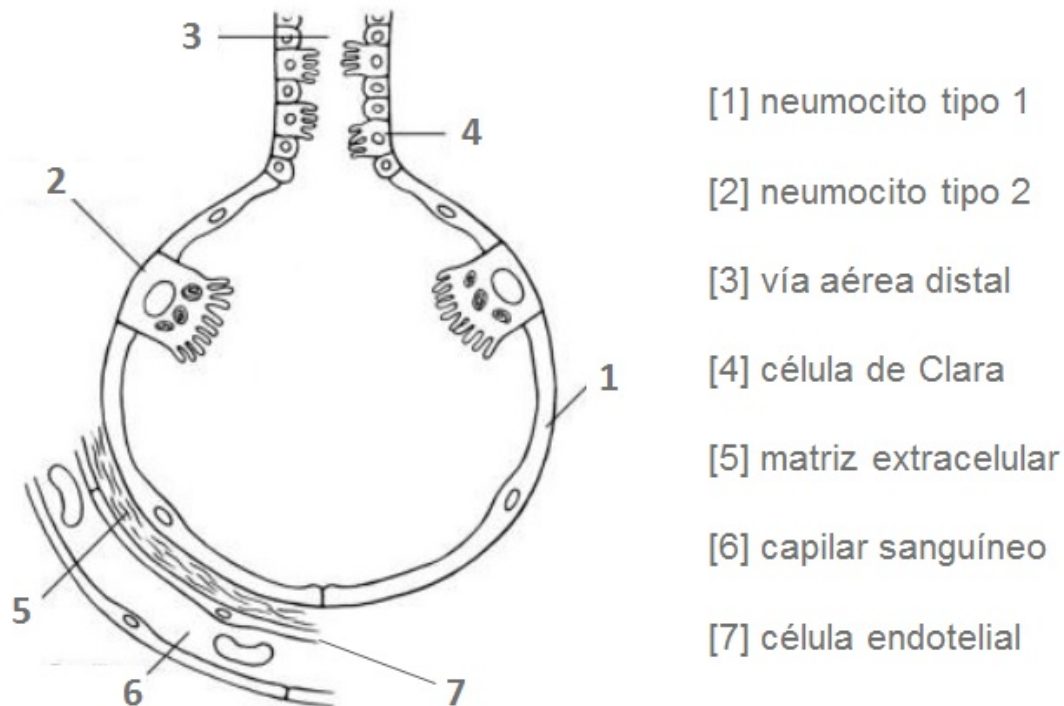


Figura 2. – Representación esquemática de la estructura de un alvéolo y las células que lo componen

6. TERAPIAS CONTRA EL DESARROLLO DE ENFISEMA

A día de hoy no se ha desarrollado ningún tratamiento efectivo que repare los daños provocados por el desarrollo de enfisema. En 1997, Massaro y colaboradores afirmaron que el tratamiento con ácido retinoico, un derivado de la vitamina A, restauraba la arquitectura normal de los pulmones de ratas con enfisema (82). Previamente se publicó también que en personas con EPOC moderada-severa y bajos niveles de vitamina A en suero, la toma de ésta como suplemento vitamínico inducía

una mejora de la función pulmonar (94). Sin embargo, años después se determinó que el empleo del ácido retinoico en personas con enfisema no tenía ningún efecto terapéutico (76). Del mismo modo, en otros modelos animales con enfisema inducido tampoco se pudo demostrar que el tratamiento con ácido retinoico favoreciera la recuperación del epitelio alveolar (45, 86, 114). Más recientemente, Takahashi y colaboradores han destacado que la administración de simvastatina, inhibidor de la síntesis del colesterol con propiedades anti-inflamatorias, promueve también la proliferación de células epiteliales y revierte el enfisema inducido por elastasa en ratones (127). Otro tratamiento aprobado en los últimos años está basado en la administración de estimuladores de la enzima guanilato ciclasa soluble (sGC), la cual presenta propiedades antiinflamatorias y participa en el mantenimiento del tono muscular, y cuya expresión está disminuida tanto en personas con EPOC como en modelos animales expuestos al humo de tabaco (46, 138).

Otra alternativa sería el desarrollo de tratamientos con factores de crecimiento. En este sentido, se han descrito las propiedades mitogénicas y morfogénicas del HGF en el epitelio alveolar de ratones (53, 92), así como su capacidad de estimular angiogénesis mediante la movilización de células progenitoras endoteliales en ratones con enfisema inducido (60). Del mismo modo, el empleo de KGF también favorece la proliferación de los neumocitos tipo 2 (131). Además se ha destacado su efecto protector frente al desarrollo de enfisema (101) en un modelo de ratón. Una tercera alternativa, sería el empleo de células madre, cuya capacidad de proliferación y diferenciación en otros tipos celulares puede ser de utilidad para restaurar el epitelio pulmonar afectado (1, 59, 93).

7. FACTOR DE CRECIMIENTO DE HÍGADO: LGF

El factor de crecimiento de hígado (LGF, por sus siglas en inglés) es un complejo albúmina-bilirrubina con un peso molecular de 64.000 KDa (35) cuyos niveles en suero son indetectables en condiciones normales. Sus propiedades mitogénicas fueron

descritas por primera vez en un modelo de daño hepático inducido en ratas (31). También se han detectado niveles elevados de LGF en el suero de personas con hepatitis, observando que tanto la estructura como la actividad del LGF es muy similar en humanos y roedores (34). Presenta una dosis efectiva más baja que la de otros factores de crecimiento, llegando a ser eficaz a nivel de microgramos (μg) (36, 37). Tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*, se ha demostrado que la actividad del LGF promueve la síntesis de ADN y proteínas y el aumento de células PCNA⁺ (37). Las propiedades como agente antifibrótico (33) y antioxidante (20), así como los efectos regenerativos del LGF, han sido previamente descritos en otros modelos de enfermedades como por ejemplo daño hepático (32), Parkinson (47, 48, 110), degeneración testicular (96), enfermedades cardiovasculares (19, 121), hipertensión (21) y aterosclerosis (121, 126). Además, en estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo se describió el efecto anti-fibrótico del LGF en un modelo de fibrosis pulmonar inducido con Cloruro de Cadmio (79).

8. MODELOS ANIMALES POR EXPOSICIÓN AL HUMO DE TABACO

En el mundo de la ciencia, el desarrollo de modelos animales es un paso necesario y obligado, dado que posibilita la investigación de los aspectos más importantes de las enfermedades humanas y por lo tanto facilita el desarrollo de posibles tratamientos.

Normalmente en la EPOC, los modelos animales no reflejan fielmente los principales síntomas dado que ésta es una enfermedad muy compleja y depende de muchos factores. Sin embargo, mediante la exposición a gases tóxicos como el humo de tabaco, los animales empleados como modelo pueden desarrollar lesiones semejantes a las encontradas en personas con EPOC. Dependiendo de la intensidad y la duración del estímulo por inhalación, las lesiones pueden ir desde una respuesta inflamatoria aguda, hasta el desarrollo de enfisema y remodelado de las vías aéreas permitiendo el estudio de la enfermedad a nivel celular y molecular.

Los modelos de EPOC por exposición al humo de tabaco son los que mejor reflejan los mecanismos inflamatorios y patogénicos de la enfermedad y, por tanto, los que potencialmente mejor se prestan a los ensayos de nuevas terapias. La exposición al humo de tabaco se ha aplicado en numerosas especies animales, entre las que se incluyen cobayas y roedores como las más comunes (120, 139). Existen dos procedimientos generales de administración de humo de tabaco: el denominado “*nose only*” donde la combustión del cigarrillo es conducida directamente a la nariz del animal y el “*whole body*”, donde el animal es expuesto íntegramente en una cámara a una concentración controlada de humo para asegurar unos niveles estables y no tóxicos de carboxihemoglobina (COHb) (97, 98). Conceptualmente diferentes, ambos métodos se han utilizado indistintamente y se han mostrado similares en cuanto a los hallazgos referentes a la presencia de poblaciones celulares inflamatorias, niveles de citoquinas, cambios en el remodelado pulmonar y respuestas terapéuticas (69).

Normalmente, la exposición de animales al humo de tabaco es útil para inducir agrandamiento de los espacios alveolares y remodelado de las vías aéreas, así como una respuesta inflamatoria crónica. Dado que las ROS del humo de tabaco contribuyen al aumento del estrés oxidativo (74, 103), la exposición de animales al humo de tabaco es útil también para estudiar las consecuencias del aumento del estrés oxidativo en los pulmones (3, 18). Sin embargo, el tipo de daño generado y las consecuencias a nivel funcional en los modelos animales no son del todo equiparables a lo que ocurre en personas afectadas por la enfermedad. Morfológicamente, en los modelos animales expuestos al humo de tabaco, las alteraciones provocadas consisten en el desarrollo de enfisema y un leve remodelado de las vías aéreas. Además, tras finalizar el periodo de exposición la enfermedad no progresa. En este contexto, el tipo de daño inducido en modelos animales no llega a ser equivalente al grado de daño observado en personas con EPOC avanzada (27).

El uso de ratones como modelo de EPOC está muy extendido debido a su bajo coste y fácil manejo, al buen conocimiento de su genoma, a la disponibilidad de muchas variantes transgénicas, a la disponibilidad de una variada oferta de

anticuerpos específicos para su uso en el laboratorio y a la disponibilidad de una amplia gama de cepas que ofrecen diferentes susceptibilidades en su respuesta al humo de tabaco (5, 15, 50, 77). Si la exposición se realiza durante un periodo de 3 a 6 meses, se puede generar el patrón morfométrico pulmonar de la EPOC con presencia de células inflamatorias típicas, mediadores de inflamación y cambios funcionales propios de la enfermedad (116). Las cobayas también presentan algunas ventajas a la hora de generar modelos de EPOC ya que son animales muy susceptibles para desarrollar la enfermedad tras pocos meses de exposición (140), pero la escasa disponibilidad de anticuerpos específicos supone una gran limitación para su uso como modelo de esta enfermedad. Por el contrario, las ratas son más resistentes para desarrollar alteraciones por exposición al humo de tabaco y por lo tanto su uso como modelo de EPOC es menos frecuente (124).

Objetivos

La EPOC es una enfermedad compleja cuyo desarrollo depende de múltiples factores. Además los síntomas más característicos de la EPOC se manifiestan con mayor intensidad en estadios avanzados de la enfermedad, lo cual hace que sea complicado tanto su diagnóstico temprano, como el desarrollo de tratamientos que puedan revertir esos síntomas. Por otro lado, las propiedades terapéuticas del LGF han sido previamente descritas en otros modelos de enfermedad pulmonar y extrapulmonar. En este contexto, esta tesis plantea el estudio de los efectos derivados del tratamiento con LGF en el enfisema pulmonar previamente establecido, en un modelo murino inducido mediante exposición crónica al humo de tabaco. Para ello se han planteado los siguientes objetivos:

- Analizar los posibles efectos terapéuticos del LGF a nivel pulmonar.
- Determinar cuáles son las posibles vías de acción del LGF.
- Establecer un modelo de ratón con enfisema inducido por exposición al humo de tabaco.
- Evaluar las alteraciones morfológicas y funcionales a nivel pulmonar en los ratones expuestos al humo de tabaco.
- Detectar a nivel molecular, los cambios en la expresión de metaloproteasas y sus inhibidores, marcadores de estrés oxidativo y marcadores de proliferación.

Material y métodos

1. MODELO ANIMAL DE ENFISEMA

1.1 Animales de experimentación

Para el desarrollo de los estudios, se emplearon ratones macho de 8 semanas de edad de la cepa C57BL/6j (Charles River Laboratories). Los animales se mantuvieron en jaulas en el estabulario del IIS-Fundación Jiménez Díaz con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Durante el periodo de estudio se alimentaron con pienso estándar libre de alfalfa (UAR Panlab) y agua *ad libitum*. Todos los experimentos llevados a cabo con estos ratones fueron aprobados por el comité ético sobre experimentación animal del IIS-Fundación Jiménez-Díaz.

1.2 Desarrollo del modelo de enfisema

Para el desarrollo del modelo de enfisema se emplearon 40 ratones de la cepa C57BL/6j de los cuales, 20 animales fueron expuestos al humo de 4 cigarrillos (3RF4, Universidad de Kentucky) al día. Cada cigarrillo se mantuvo en combustión durante 5 minutos y se estableció un intervalo de 10 minutos entre cada cigarrillo. Este protocolo se aplicó 5 días a la semana durante 6 meses. Los otros 20 ratones fueron expuestos paralelamente a aire ambiental constituyendo así el grupo control. Las características físico-químicas del tabaco empleado aparecen resumidas en la Tabla 2.

Tabla 2. Características físico-químicas de los cigarrillos 3R4F

Parámetros	Cigarrillos 3R4F
<i>Parámetros físicos:</i>	
longitud (mm)	84
circunferencia (mm)	24,5
peso (g)	1,05
permeabilidad del papel (sec/50 ml)	24
<i>Parámetros químicos:</i>	
calada por cigarrillo	9
contenido total de partículas (mg/cig)	11
alquitrán (mg/cig)	9,4
nicotina (mg/cig)	0,7
monóxido de carbono (mg/cig)	12

1.3 Modo de exposición al humo de tabaco

Los ratones se situaron en grupos de 10 en una cámara de exposición, al interior de la cual, se bombeó el humo de un cigarrillo junto con aire exterior (relación v/v 1:6) para evitar síntomas de asfixia en los ratones (Figura 3). Para generar una corriente hacia el interior de la cámara de exposición se empleó una bomba peristáltica (modelo 7518-00; Cole-Parmer Instrument Company). El grupo control fue sometido al mismo protocolo, pero sin humo de tabaco. Durante el periodo de exposición y de forma periódica, se comprobó la eficiencia de la exposición, mediante el análisis de los niveles de COHb en sangre, 30 minutos después de la exposición, mediante un CO-Oxímetro (IL 682TM; Instrumentation Laboratory). La extracción de sangre se realizó a través de la punción del seno retro-orbital de los animales. Por otro lado, el peso de cada ratón fue anotado al inicio, al tercer, al cuarto, al quinto y al sexto mes del periodo de exposición.

2. ADMINISTRACIÓN DEL LGF

El LGF fue proporcionado por el grupo del Dr. Díaz-Gil del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid, donde fue aislado, purificado, liofilizado y almacenado a 4°C después de comprobar la ausencia de otros factores de crecimiento y/o contaminantes en la preparación. Antes de administrar el LGF a los ratones, se resuspendió en solución salina (0,9% NaCl; Braun). 24 horas después de finalizar el periodo de exposición al humo de tabaco, a cada ratón se le administraron 4 inyecciones de LGF durante un periodo de 2 semanas a razón de dos inyecciones por semana. En cada inyección la dosis óptima de LGF fue de 1,7 µg por ratón, con la que previamente se había detectado actividad reparadora en modelos de otras enfermedades (Figura 4A). Los 20 ratones que fueron previamente expuestos al humo de tabaco, se dividieron en dos grupos de 10 ratones: a los ratones de un grupo se les administró LGF siguiendo el protocolo anterior, mientras que al otro grupo solo se le administró solución salina para establecer el grupo control. El mismo procedimiento se siguió con los 20 ratones que sólo fueron expuestos previamente a aire ambiental (Figura 4B).

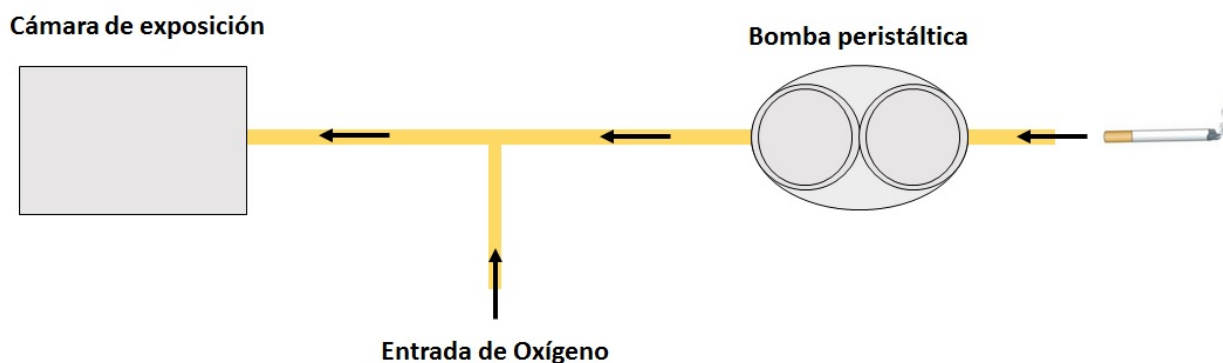


Figura 3. Representación esquemática del sistema de exposición “whole body” al humo de tabaco.

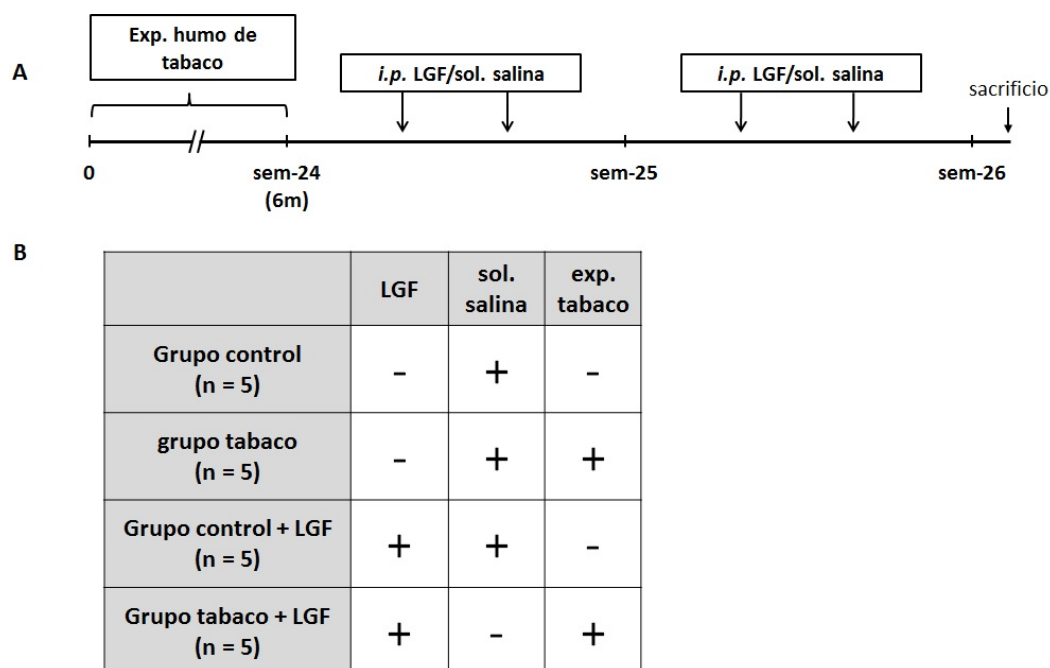


Figura 4. (A) Protocolo experimental para la administración de LGF. **(B)** Representación de los grupos experimentales en función de la exposición y del tratamiento con LGF.

3. TÉCNICA DE IMAGEN MOLECULAR DE FLUORESCENCIA *in vivo*

Los animales se mantuvieron anestesiados durante la toma de imágenes con una mezcla del 2% de isoflurano (Forane; Abbott Laboratorios), 2 l/min de oxígeno usando un sistema de anestesia inhalatoria (Harvard Apparatus). Previo a la adquisición de las imágenes, a cada ratón se le administraron a través de la vena de la cola, 2 nmoles diluidos en 150 μ l PBS de una sonda capaz de emitir fluorescencia al ser activada específicamente por metaloproteasas (MMPSense™680; VisEn Medical). La longitud de onda de excitación es de 680 nm y la de emisión de 700 nm, la vida media es de 24 horas en sangre y de 72 horas en tejido y se metaboliza en el hígado. 24 horas después de la inyección de la MMPSense™680 y de la exposición a tabaco, se adquirieron imágenes mediante un equipo de fluorescencia molecular (IVIS-Lumina; Caliper Life Sciences Inc.) que consiste en una lámpara halógena de tungsteno de 150

watt con un reflector dicróico que genera luz de excitación incidente y una cámara CCD enfriada a -90°C , con un campo de visión a 7,5 cm sobre la posición de la muestra, ubicada a su vez en una cámara oscura acoplada a un sistema informático basado en Windows. Dado que el pelo de los ratones impide que el equipo detecte la emisión de fluorescencia procedente de los pulmones, fue necesario afeitar la zona del tórax de cada ratón y aplicar crema depilatoria para eliminar el pelo. Las imágenes se analizaron usando el software Living Image® 3.1 (Xenogen Corporation). Este software usa la técnica de la descomposición espectral (*spectral unmixing*) para reducir los efectos de la autofluorescencia que se desprende de muchos tejidos y calcular la contribución específica del fluoróforo utilizado. La señal fluorescente detectada en cada animal depende de la cantidad de fluoróforo presente en la muestra y de la intensidad de la luz de excitación incidente.

4. ESTIMACIÓN DE LA FUNCIÓN PULMONAR

Para analizar la calidad de la función pulmonar, se utilizó el parámetro V_{max} que refleja el volumen máximo de aire que soportan los pulmones al alcanzar una presión de 30 mbares. Para ello se utilizó un respirador/ventilador electrónico diseñado y testado previamente por el Dr. Ruiz Cabello y colaboradores (67). Para el registro de este parámetro, a cada ratón se le administró una dosis de xilacina/ketamina (100 μl /ratón 1:2 v/v). Bajo un estado de anestesia profunda, a cada animal se le acopló quirúrgicamente una cánula en la tráquea, la cual a su vez se conectó al respirador/ventilador mediante un pequeño tubo elástico. Una vez que el animal queda conectado al respirador/ventilador, éste introduce aire en los pulmones del animal hasta que detecta que la presión alcanzada es de 30 mbares. En este punto, registra el volumen de aire insuflado y representa gráficamente, en una pantalla acoplada al dispositivo, la curva inspiratoria correspondiente. Segundos antes de la adquisición, a cada ratón se le administra una dosis de relajante muscular (Nimbex; Glaxosmithkline) para detener momentáneamente la respiración espontánea del animal y evitar así interferencias en los resultados. Los efectos de este relajante son

transitorios, de modo que al finalizar la adquisición los ratones vuelven a respirar de forma natural.

5. TEJIDO PULMONAR

5.1 Extracción del bloque pulmonar

24 horas después de la última dosis de LGF y dos semanas después de la última sesión de exposición al humo de tabaco, y después de finalizar los estudios funcionales, los animales fueron sacrificados mediante la inyección de una dosis letal de anestésico (Tiobarbital; Braun). Los animales fueron perfundidos con suero salino antes de extraer el bloque pulmonar. De cada grupo (n = 10), los bloques pulmonares de 5 ratones fueron depositados en nitrógeno líquido inmediatamente después de su extracción y almacenados posteriormente a -80°C para futuros experimentos bioquímicos. Los bloques pulmonares de los otros 5 ratones fueron fijados por vía intra-traqueal durante 24 horas con formalina al 4% (Sigma-Aldrich, Co.) a una presión de 25 cm de H₂O para una correcta apertura de los alveolos sin dañar la estructura pulmonar. Posteriormente fueron incluidos en bloques de parafina para llevar a cabo técnicas sobre cortes histológicos.

5.2 Análisis morfométrico

La morfometría pulmonar se evaluó sobre cortes de 5 µm teñidos con hematoxilina-eosina (Sigma-Aldrich), obtenidos a partir de los pulmones previamente fijados e incluidos en bloques de parafina. Para visualizar las imágenes se empleó una videocámara (Leica DFC290; Leica Microsystems), adaptada a un microscopio (Olympus BX40), utilizando el objetivo x40. Para determinar el agrandamiento de los espacios alveolares, se cuantificó la distancia media entre las paredes alveolares (Lm) y

el área interna alveolar (AIA) mediante un programa de análisis de imágenes (Qwin V3; Leica Microsystems). Este programa detecta, por la diferencia de contraste, los espacios alveolares dentro de un campo seleccionado al azar en un corte histológico. Antes de cuantificar los espacios alveolares, es necesario limpiar manualmente la imagen para eliminar posibles artefactos que den lugar a un análisis erróneo. Finalmente, el programa determina el número de espacios alveolares en cada imagen, junto con el valor medio de Lm y AIA. Por cada ratón se analizaron 18 imágenes seleccionadas aleatoriamente y representativas de la histología pulmonar de cada ratón.

5.3 Inmunohistoquímica para la detección de células positivas para PCNA

La detección de células PCNA⁺ en cortes histológicos de pulmón, se llevó a cabo mediante la técnica de Inmunohistoquímica. Para ello, cortes de 5 µm fueron desparafinados a 61°C durante 2 horas y rehidratados mediante baños seriados en etanol a concentraciones decrecientes dejando los cortes finalmente en agua destilada. Para inhibir la peroxidasa endógena, los cortes permanecieron 30 minutos en una solución de agua oxigenada (Sigma-Aldrich) al 3% en metanol. Para la recuperación antigénica, los cortes se calentaron durante 20 minutos al baño maría (90°C) en buffer citrato a pH 6. Después de bloquear con buffer de bloqueo (10% BSA + 5% suero de cabra en PBS) durante 30 minutos en cámara húmeda y a temperatura ambiente, los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario anti-PCNA (dilución 1:100; Sigma-Aldrich) durante toda la noche a 4°C y en cámara húmeda. Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario y se incubaron los cortes con el anticuerpo secundario conjugado con biotina (Novus Biologicals) durante 30 minutos a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Para aumentar la señal positiva para PCNA, los cortes se incubaron con una solución de avidina/biotina conjugadas a su vez con peroxidasa (Vectastain Elite ABC solution; Vector Laboratories) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, los cortes se incubaron con el sustrato de la peroxidasa (DAB; Thermo Scientific) durante 10 minutos hasta que se observó el

cambio de color. Seguidamente se realizó una tinción de contraste con hematoxilina de Mayer. Finalmente, los cortes histológicos se deshidrataron con baños de etanol a concentraciones crecientes y se montaron con medio de montaje (DPX, Fisher Scientific). Para establecer los controles negativos de marcaje, se siguió el mismo protocolo, pero en lugar de incubar con anticuerpo primario, se incubaron los cortes únicamente con la solución de dilución del anticuerpo. Para cuantificar las células PCNA⁺, se seleccionaron 30 imágenes por ratón de forma aleatoria con una videocámara (Leica Microsystems) acoplada a un microscopio óptico (Olympus BX40).

6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS DE TEJIDO PULMONAR

6.1 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se calculó mediante el método colorimétrico del BCA (Pierce Protein Research Products). Para calcular la concentración de proteína, los valores de absorbancia de las muestras a 540 nm se interpolaron en una recta patrón realizada a partir de una solución de albúmina sérica bovina (BSA) con valores entre 0 y 2 µg/µl de BSA

6.2 Western-blot

Para la inmunodetección de las proteínas de interés se emplearon 20 µg de extracto total de proteína solubilizados en buffer de carga y desnaturalizados a 95°C durante 5 minutos. Las proteínas se sometieron a electroforesis SDS-PAGE en geles al 10% de poliacrilamida. Después se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore) mediante transferencia en húmedo, a 100 voltios durante 1 hora. Posteriormente, dichas membranas fueron bloqueadas durante 1 hora en TBS (9% NaCl + Tris-HCl 1M pH 7,4) con un 10% de leche desnatada para impedir la unión de los anticuerpos

primarios a proteínas inespecíficas. La incubación con el anticuerpo primario correspondiente (tabla 3) se llevó a cabo en ligera agitación, durante toda la noche y a 4°C. Al día siguiente, las membranas se lavaron alternativamente con TBS y TBS-Tween 0,05% y se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (1:1.500; Biolegend) durante 1 hora y a temperatura ambiente. Para visionar las bandas, se empleó un kit para la detección de quimioluminiscencia (ECL Plus; GE Healthcare) y para densitometrar las bandas se utilizó el programa Quantity-One (Bio-Rad). Las bandas correspondientes a la α -Tubulina (1:8.000, Sigma-Aldrich) se utilizaron para normalizar los resultados.

Tabla 3. Lista de anticuerpos primarios utilizados para western-blot

ANTICUERPOS (anti-)	DILUCIÓN ANTICUERPO 1º	ALTURA BANDA (kDa)	CASA COMERCIAL
MMP-12	1:2000	45	Novus Biologicals
VEGF	1:400	28	Novus Biologicals
Nrf2	1:1000	68	Novus Biologicals
TIMP-1	1:250	23	R&D Systems
TIMP-2	1:250	22	Biolegend
PCNA	1:500	31	Sigma-Aldrich
3-NT	1:200	-	Santa Cruz Biotechnology
Tubulina	1:2500	50	Novus Biologicals

7. EXTRACCIÓN DE ARN, RETROTRANSCRIPCIÓN Y PCR EN TIEMPO REAL

7.1 Extracción de ARN

Los bloques pulmonares conservados a -80°C fueron triturados de forma mecánica sin perder la cadena de frío y posteriormente se homogeneizaron en trizol (TRI-REAGENT™; Sigma-Aldrich) a razón de 50 μg de tejido en 1 ml de trizol. Para la extracción de ARN, se añadió cloroformo en la proporción de 200 μl por cada 1 ml de trizol, se mezclaron bien y se dejaron reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se centrifugaron a 12.000xg durante 10 minutos a 4°C para recuperar después la fase superior acuosa a la que se le añadieron 0,5 ml de isopropanol por cada 1 ml de trizol añadidos inicialmente. Seguidamente se agitaron los tubos, se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos y se volvieron a centrifugar a 12,000xg durante 10 minutos a 4°C descartando el sobrenadante. El precipitado que quedó en el fondo de cada tubo, se resuspendió en etanol al 75% y se centrifugó a 7.500xg durante 5 minutos a 4°C . Finalmente se descartó el sobrenadante con cuidado de no arrastrar el precipitado y las muestras se dejaron secar para posteriormente ser resuspendidas en agua DEPC. Para conocer la concentración de ARN, se midió su absorbancia a 260/280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop.

7.2 Retrotranscripción (RT)

Para la RT se utilizó un kit comercial (High-Capacity cDNA Archive Kit; Applied Biosystems) a partir de 2 μg de ARN total resuspendidos en un volumen de 10 μl y las concentraciones de reactivos indicadas en la tabla 4. La mezcla de reacción se incubó bajo las siguientes condiciones: a 25°C durante 10 min, a 37°C durante 2 horas (transcripción reversa) y a 85°C durante 5 minutos (inactivación de la transcriptasa

inversa). Tras enfriar a 4°C el ADNc se diluyó 1:5 veces con agua milliQ estéril (volumen final de 200 µl) y los tubos se almacenaron a -20°C.

Tabla 4. Mezcla de reactivos para la retrotranscripción.

Reactivo	Volumen (µl/pocillo)
10X RT Buffer	2
25X dNTP Mix (100mM)	0,8
10X Random Primers	2
Transcriptasa reversa MultiScribe™	1
RNA total (2 µg)	10
Agua libre de RNA-asas	4,2
TOTAL	20

7.3 PCR en tiempo real (PCRq)

Para llevar a cabo la PCRq, se empleó la Taqman universal master mix (Applied Biosystems). Para amplificar los fragmentos de ADNc, se utilizaron sondas prediseñadas (Taqman® gene expression assays; Applied Biosystems) y específicas para cada uno de los genes estudiados (tabla 5). Las muestras se analizaron por triplicado y los datos de expresión se normalizaron con la expresión del gen de referencia o *housekeeping* Rn18S, que codifica para la proteína 18S ribosomal.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa SPSS v11.0. (SPSS Inc.). Las posibles diferencias entre los grupos de estudio se compararon usando

el test no paramétrico de Mann-Whitney, adecuado para comparar grupos constituidos por un bajo número de individuos. Las diferencias se consideraron significativas cuando el p-valor fue inferior a 0,05 ($p < 0,05$).

Tabla 5. Sondas utilizadas en las reacciones de PCRq

<i>GENES</i>	<i>Gen Bank ID</i>	<i>Taqman® gene expression assay ID</i>	<i>fluoróforo</i>
Mmp9	NM_013599.3	Mm00442991_m1	FAM
mmp2	AK148184.1	Mm00439507_m1	FAM
Timp1	NM_001044384.1	Mm00441818_m1	FAM
Timp2	NM_011594.3	Mm00441825_m1	FAM
Rn18s	NR_003278.3	Mm03928990_g1	VIC

Resultados

1. CONFIRMACIÓN DEL MODELO DE ENFISEMA

Para evaluar los efectos de la inhalación del humo de tabaco durante todo el periodo de exposición, se realizó un seguimiento de la evolución del peso de los ratones. Así, observamos que en los animales que fueron expuestos al humo de tabaco, la ganancia de peso fue significativamente más lenta ya al tercer mes ($28,9 \pm 0,31$ gr), en comparación con el grupo expuesto a aire ambiental ($30,13 \pm 0,51$ gr). Además, en los ratones expuestos al humo de tabaco, la ganancia de peso se estabilizó desde el tercer mes hasta el final del periodo de exposición, mientras que en el grupo control, los animales continuaron ganando peso hasta el final del periodo de exposición (Figura 5).

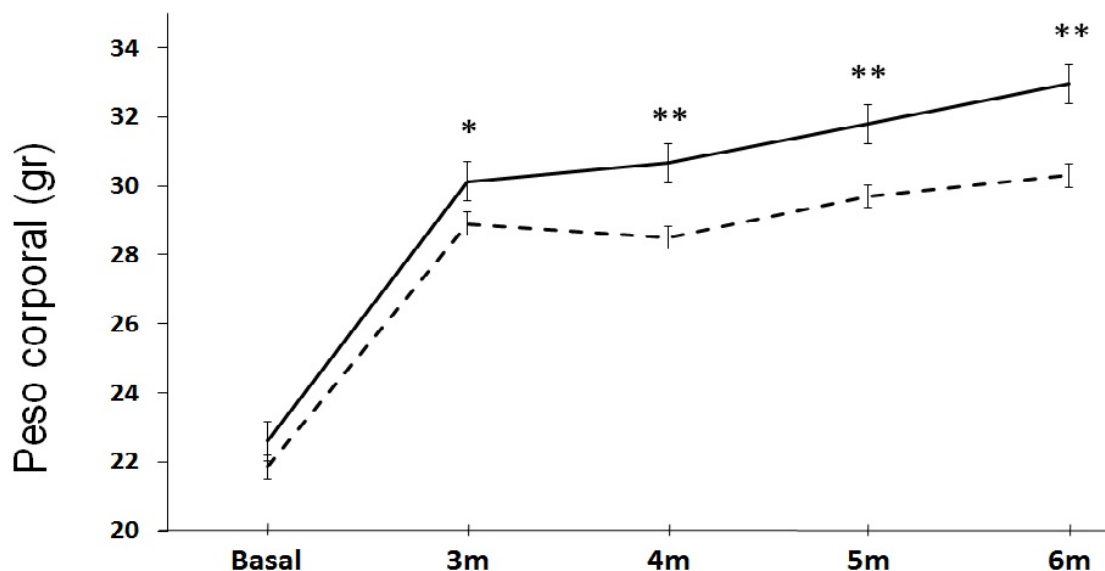


Figura 5. Evolución de la ganancia de peso corporal en ratones expuestos al humo de tabaco durante 6 meses (línea discontinua) y ratones expuestos al aire ambiental (línea continua).

* = $p < 0,05$ y ** = $p < 0,01$ grupo control vs grupo tabaco. Los datos se representan como media \pm EEM.

Por otro lado, para controlar la eficacia de la exposición al humo de tabaco y garantizar que los animales inhalaban correctamente el humo de tabaco, se midieron periódicamente los niveles de COHb en sangre 30 minutos después de la exposición al último cigarrillo. Los valores promedio de estas mediciones fueron de $20 \pm 0,47$ % de COHb en el grupo tabaco, y $0,325 \pm 0,18$ % de COHb en el grupo control.

2. EL LGF REDUCE EL DAÑO INDUCIDO POR HUMO DE TABACO

Para evaluar el grado de daño generado a nivel pulmonar como consecuencia del desarrollo de enfisema por exposición al humo de tabaco, se midieron diferentes parámetros morfométricos y funcionales como la distancia entre las paredes alveolares (L_m), el área interna alveolar (AIA) y el volumen máximo a una presión de 30 mbares (V_{max}). Los ratones que no fueron expuestos al humo de tabaco, presentaron una arquitectura alveolar normal ($L_m = 32,46 \pm 0,46 \mu m$; $AIA = 794,5 \pm 23,39 \mu m^2$), así como una función pulmonar normal ($V_{max} = 1,29 \pm 0,058$ ml) (Figura 6). Por el contrario, los ratones expuestos al humo de tabaco presentaron un aumento significativo del tamaño de los espacios alveolares ($L_m = 41,88 \pm 0,64 \mu m$; $AIA = 1.587,19 \pm 59,54 \mu m^2$) con la consecuente pérdida de función pulmonar ($V_{max} = 1,39 \pm 0,031$ ml). Sin embargo, cuando los ratones expuestos al humo de tabaco fueron tratados con LGF durante las dos semanas posteriores al periodo de exposición, los cambios tanto morfológicos como funcionales revirtieron alcanzando valores semejantes a los observados en el grupo control ($L_m = 32,04 \pm 0,35 \mu m$; $AIA = 517,18 \pm 13,13 \mu m^2$; $V_{max} = 1,30 \pm 0,044$ ml). Para verificar los posibles efectos negativos derivados del tratamiento con LGF en animales sanos, establecimos un grupo control expuesto a aire ambiental y tratado con LGF durante las dos semanas posteriores al periodo de exposición. Estos animales no presentaron alteraciones ni morfológicas ni funcionales al igual que el grupo control. De este modo verificamos que la administración de LGF en animales sanos no presentaba ningún efecto negativo en los pulmones (Figura 6).

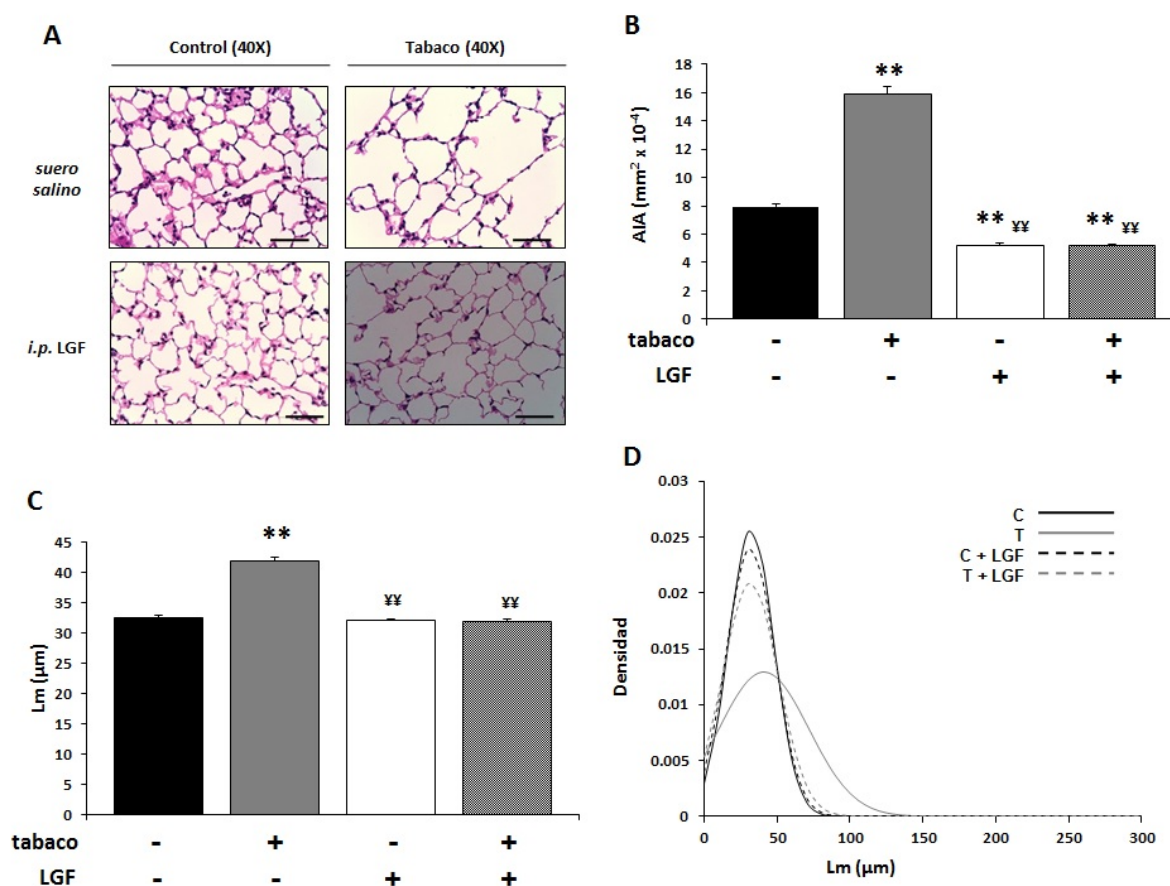


Figura 6. Agrandamiento de los espacios alveolares. **(A)** Imágenes representativas de cortes histológicos teñidos con H&E. Barras de escala = 50 μm. **(B)** gráfico que representa el valor medio correspondiente al área interna alveolar. **(C)** representación gráfica del valor medio de la distancia entre los espacios alveolares. **(D)** Análisis de la distribución de los espacios alveolares en función de su tamaño. (n = 5 por grupo). ** = p < 0,01 grupo control vs grupo tabaco y ** = p < 0,01 grupo tabaco vs grupo tabaco + LGF. Los datos se muestran como media ± EEM. C; grupo control; T: grupo tabaco; C + LGF: grupo control + LGF; T + LGF: grupo Tabaco + LGF.

3. LA MEJORA DEL DAÑO PULMONAR CORRELACIONA CON UN DESCENSO DE LA ACTIVIDAD DE LAS MMPs

La activación desmesurada de las MMPs supone la destrucción de la matriz extracelular contribuyendo al agrandamiento de los espacios alveolares. En condiciones fisiológicas normales, los inhibidores de las MMPs (TIMPs) son capaces de

regular esa actividad, pero este equilibrio enzima-inhibidor puede ser alterado dentro de un contexto patológico como ocurre en individuos con enfisema. En nuestro modelo de enfisema experimental, la actividad metaloproteásica, analizada *in vivo* mediante imagen molecular de fluorescencia, estaba dos veces más elevada en los ratones expuestos al humo de tabaco en comparación con el grupo control. Sin embargo, cuando los ratones expuestos al humo de tabaco fueron tratados posteriormente con LGF, observamos un descenso en la actividad metaloproteásica alcanzando niveles semejantes a los observados en los animales del grupo control (Figura 7).

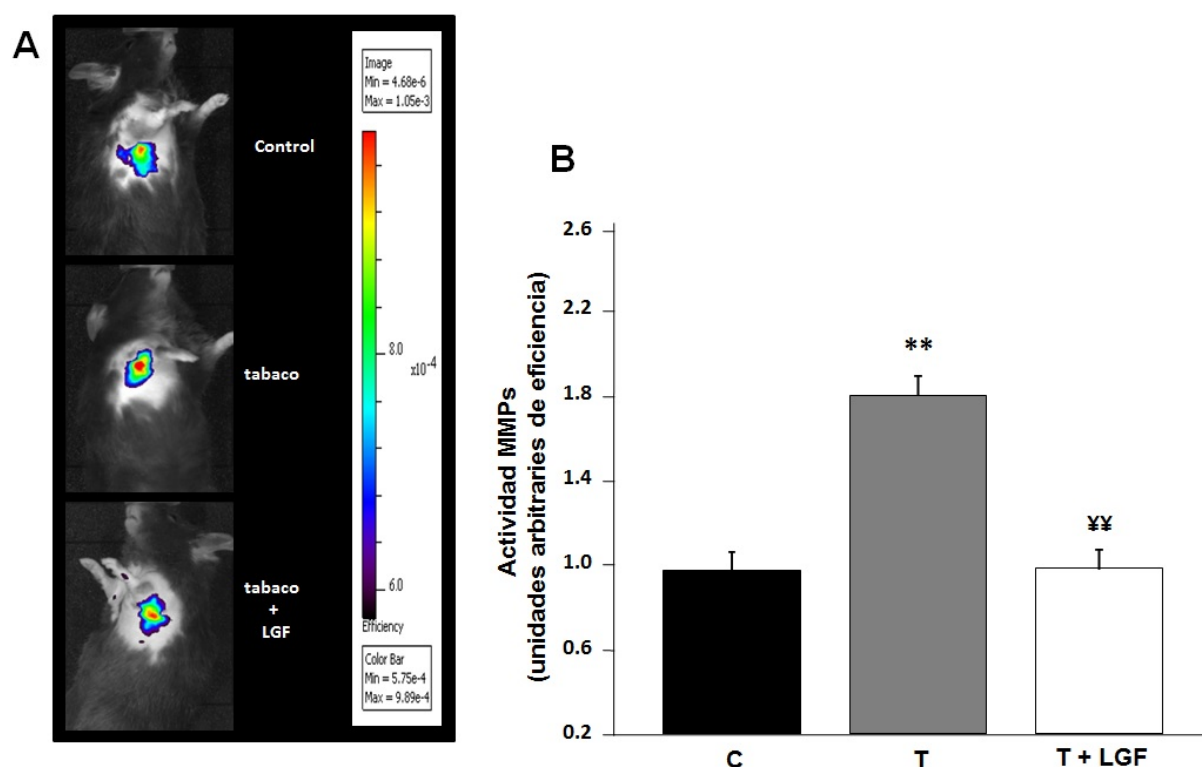


Figura 7. Actividad de las MMPs *in vivo*. **(A)** imágenes que muestran la región lateral del tórax de un ratón representativo de cada grupo. **(B)** Gráfico de barras que muestra los valores de eficacia en tanto por uno correspondiente a la actividad de las MMPs en el pulmón. (n = 5 por grupo). Los datos se muestran como la media \pm EEM. ** = $p < 0,01$ grupo control vs grupo tabaco y ¥¥ = $p < 0,01$ grupo tabaco vs grupo tabaco + LGF.

4. DESEQUILIBRIO PROTEASA-ANTIPROTEASA

Como se explica anteriormente, el desequilibrio proteasa-antiproteasa es un aspecto importante para el desarrollo de enfisema. En nuestro modelo animal de enfisema, quisimos analizar la expresión a nivel de ARNm tanto de las MMPs más relevantes en el desarrollo de enfisema (MMP-9 y MMP-2), como de sus inhibidores TIMP-1 y TIMP-2 y comparar a su vez estos resultados con los resultados obtenidos previamente de la actividad metaloproteásica *in vivo*. Los resultados obtenidos mediante PCRq revelaron que la expresión del gen Mmp9 estaba disminuida en los ratones expuestos al humo de tabaco y tratados con LGF posteriormente, en comparación con el grupo tabaco sin tratamiento con LGF (Figura 8A). Además, comparando los mismos grupos, observamos que la expresión de los genes Timp1 y Timp2 resultó estar aumentada (Figura 8C y D). Sin embargo, los resultados no mostraron ninguna variación, entre estos dos grupos, en la expresión del gen Mmp2 (Figura 8B).

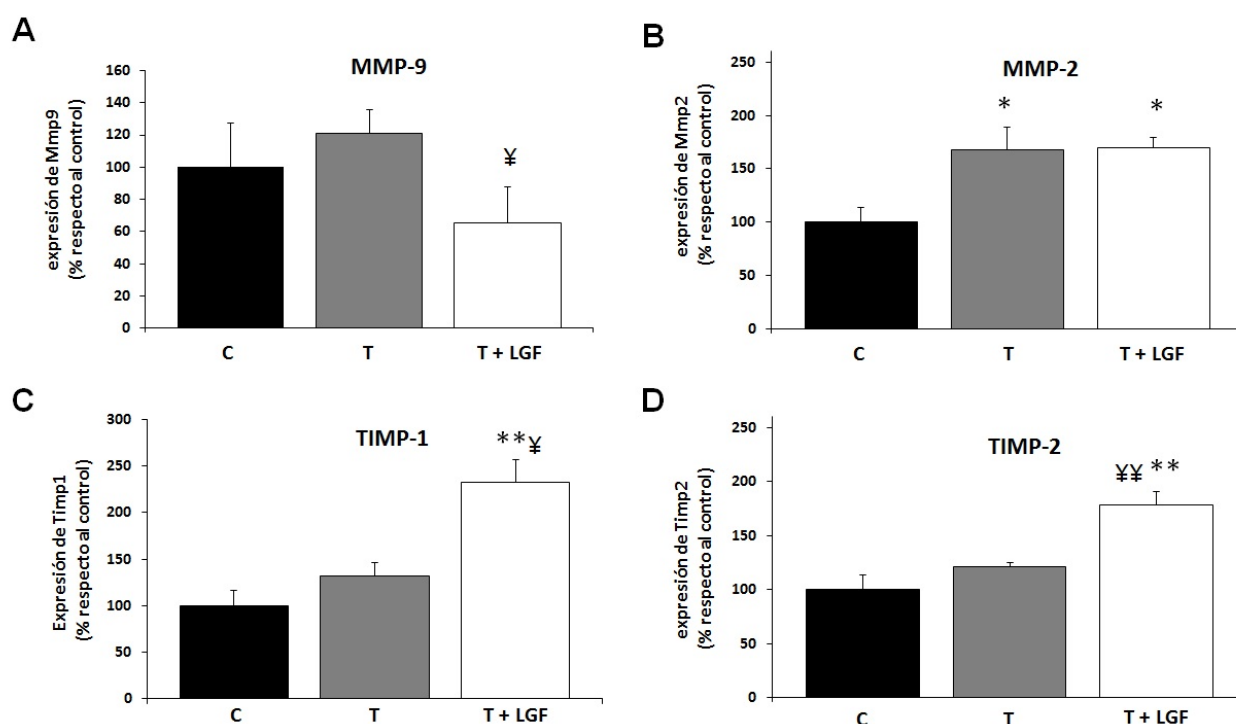


Figura 8. Expresión a nivel de ARNm mediante PCRq. Los resultados se muestran en relación al grupo control, al cual se le asignó un valor de expresión del 100%. Los datos se muestran como la media \pm EEM. (n = 5 por grupo). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ grupo control vs grupo tabaco y ¥ = $p < 0,05$; ¥¥ = $p < 0,01$ grupo tabaco vs grupo tabaco + LGF

5. EL DESCENSO DE LA ACTIVIDAD DE LAS MMPs CORRELACIONA CON UN DESCENSO EN LOS NIVELES DE MMP-12

Un inconveniente de la sonda MMPsense™680 es que no es activable por la MMP-12, por lo que recurrimos a la técnica de Western-blot para determinar los niveles de esta proteína en el tejido pulmonar de los ratones pertenecientes al grupo control, grupo tabaco y grupo tabaco + LGF. Los resultados revelaron que los niveles de MMP-12 en los pulmones de los ratones expuestos al humo de tabaco eran ligeramente mayores que en el grupo control, aunque la diferencia no fue significativa. Por el contrario, cuando los ratones expuestos al humo de tabaco fueron posteriormente tratados con LGF, observamos un descenso aproximado del 30% en los niveles de MMP-12 en tejido pulmonar (Figura 9B).

Para constatar el posible desequilibrio proteasa-antiproteasa descrito anteriormente, analizamos también la relación de los niveles de la MMP-12 frente a los niveles de sus inhibidores. Así, observamos que la relación MMP-12/TIMP-1 era ligeramente mayor en el grupo expuesto al humo de tabaco que en el grupo control, aunque las diferencias no fueron significativas (Figura 9C). En cambio, no vimos diferencias sustanciales entre los dos grupos al analizar la relación MMP-12/TIMP-2 (Figura 9D). Sin embargo, en el grupo expuesto al humo de tabaco y tratado después con LGF vimos que las relaciones MMP-12/TIMP-1 y MMP-12/TIMP-2 eran aproximadamente un 20% y un 40% menores respectivamente cuando las comparamos con el grupo tabaco (Figura 9C-D).

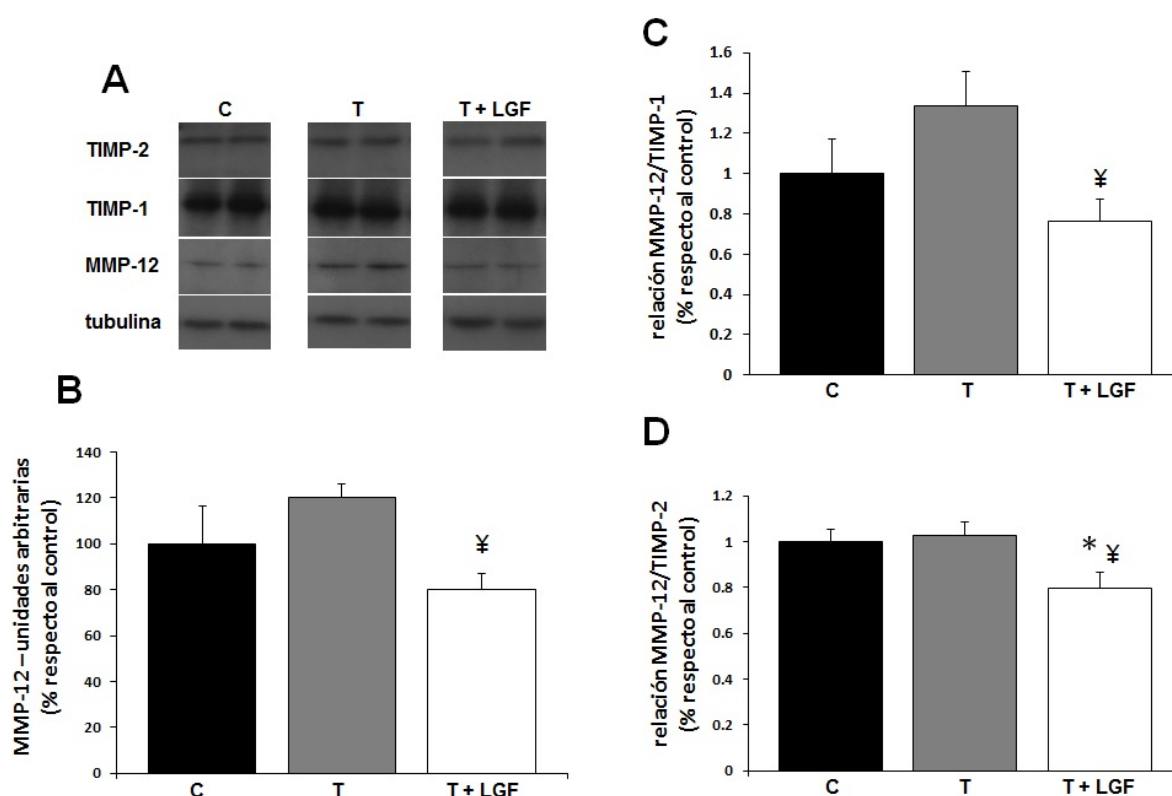


Figura 9. (A) imágenes correspondientes a bandas de proteínas representativas de cada grupo. (B) Representación gráfica de los niveles de MMP-12 analizados mediante western-blot. Los datos fueron normalizados con tubulina. (C-D) representación gráfica de la relación MMP-12/TIMP-1 y MMP-12/TIMP-2 respectivamente. Los datos se muestran en % respecto al control (n = 5 por grupo). Los valores corresponden a la media \pm EEM. * = $p < 0,05$ grupo control vs grupo tabaco; ¥ = $p < 0,05$ grupo tabaco vs grupo tabaco + LGF.

6. EFECTO PROLIFERATIVO DEL LGF SOBRE EL EPITELIO ALVEOLAR

En estudios previos en otros modelos de enfermedades, se han descrito las propiedades mitogénicas del LGF. Por este motivo, en nuestro estudio quisimos evaluar los posibles efectos proliferativos del LGF sobre el tejido pulmonar dañado mediante el análisis de los niveles de VEGF y PCNA por western-blot. Los niveles de VEGF en tejido pulmonar descendieron alrededor de un 30% en el grupo expuesto al humo de tabaco con respecto al grupo control, mientras que al ser tratados con LGF,

los niveles de VEGF incrementaron alcanzando niveles semejantes a los observados en el grupo control (Figura 10A). En cuanto a la expresión de PCNA, los niveles incrementaron aproximadamente un 40% en los ratones expuestos al humo de tabaco y tratados después con LGF, en comparación con el grupo tabaco sin tratamiento (Figura 10B).

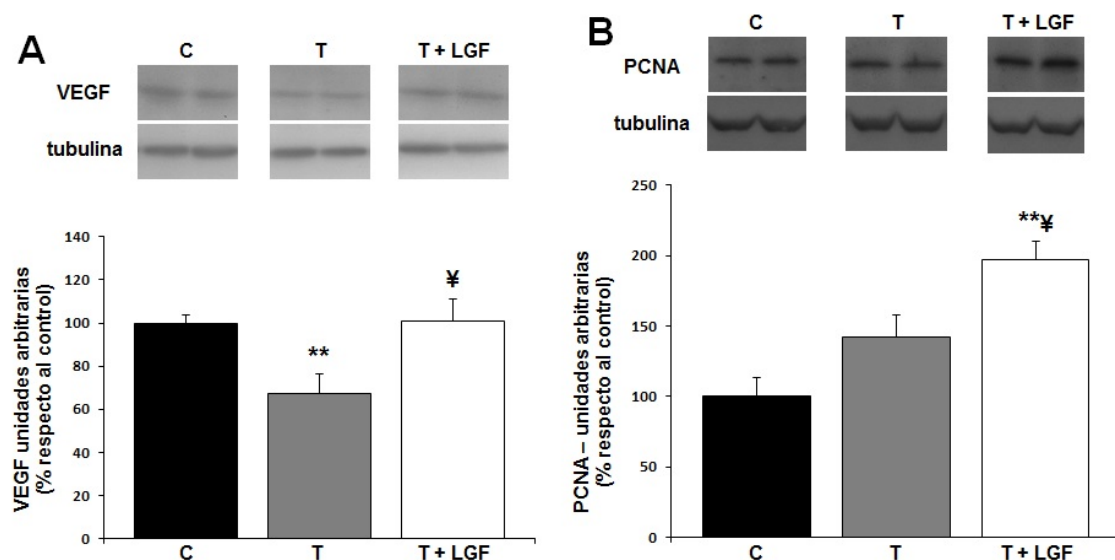


Figura 10. Niveles de VEGF y PCNA en tejido pulmonar. Los resultados se muestran en % respecto al grupo control, al cual se le asignó un valor del 100%. Los datos fueron normalizados con tubulina (n = 5 por grupo). Los datos se muestran como la media \pm EEM. ** = $p < 0,01$ grupo control vs grupo tabaco; ¥ = $p < 0,05$ grupo tabaco vs grupo tabaco + LGF.

Dado que los resultados anteriores evidenciaron un incremento de la expresión de marcadores de proliferación, quisimos determinar sobre qué población celular estaba ejerciendo el tratamiento con LGF, su acción proliferativa. Para ello localizamos las células PCNA⁺ en cortes histológicos mediante marcaje por inmunohistoquímica. Los resultados mostraron que en los cortes histológicos de ratones expuestos al humo de tabaco y tratados con LGF, había mayor número de células PCNA⁺ (151,3 cels/mm²) en comparación con el grupo expuesto al humo de tabaco que no recibió tratamiento

con LGF (75,8 cels/mm²). Además, las células PCNA⁺ correspondían a los neumocitos tipo 2 (Figura 11).

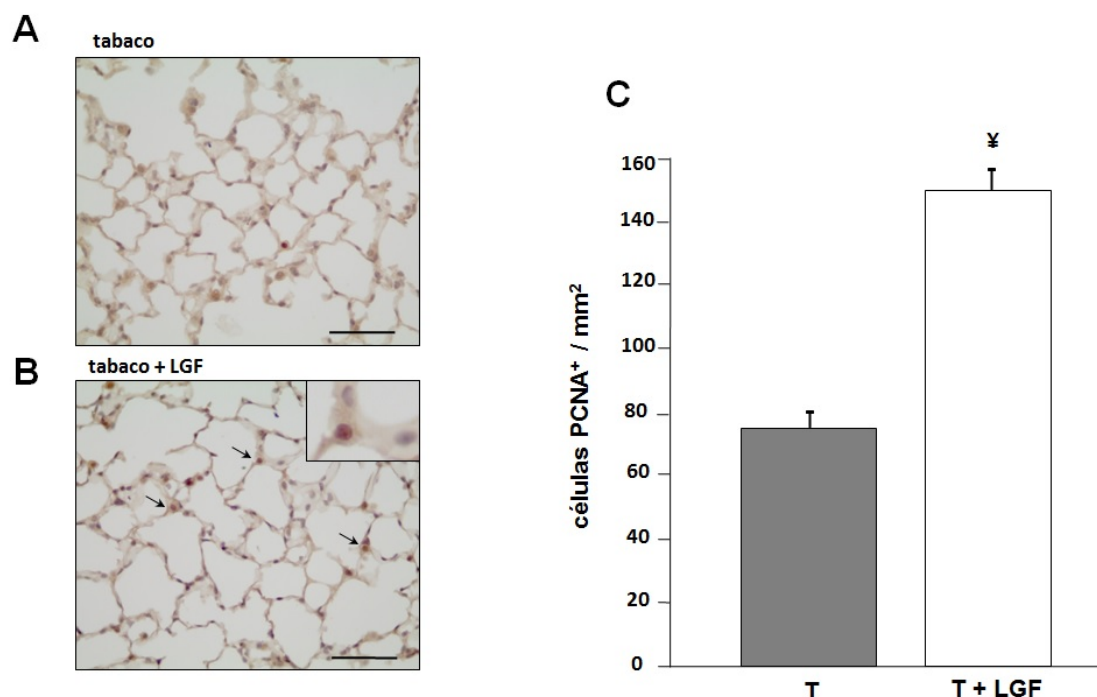


Figura 11. Análisis de la proliferación celular. Imágenes representativas de los grupos tabaco (A) y tabaco + LGF (B) correspondientes a cortes histológicos con tinción específica para PCNA. Las flechas señalan células PCNA⁺. En la imagen (B) se resalta un neumocito tipo 2 PCNA⁺. Barras de escala = 50 μ m. (C) cuantificación de las células PCNA⁺ por área de tejido. (n = 5 por grupo). Los datos se muestran como media \pm EEM. ¥ = p < 0,05 grupo tabaco vs grupo tabaco + LGF.

7. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON LGF SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO

Para estudiar si el tratamiento con LGF podría tener efectos sobre el estrés oxidativo generado en los pulmones, estudiamos los niveles de 3-nitrotirosina (3-NT) como marcador de estrés oxidativo y el factor de transcripción Nrf2 como marcador de respuesta antioxidante mediante western-blot. Lo que observamos fue que la exposición a largo plazo al humo de tabaco, provocó un incremento del 20% aproximadamente de los niveles de 3-NT con respecto al grupo control. Sin embargo,

cuando los ratones expuestos al humo de tabaco fueron tratados con LGF, los niveles de 3-NT descendieron a niveles semejantes a los observados en el grupo control (Figura 12A). Del mismo modo, los resultados no mostraron variaciones en los niveles de Nrf2 en los ratones expuestos al humo de tabaco con respecto al grupo control, pero sí que mostraron un incremento aproximado del 30% de los niveles de Nrf2 cuando a los ratones expuestos al humo de tabaco se les administró posteriormente LGF (Figura 12B).

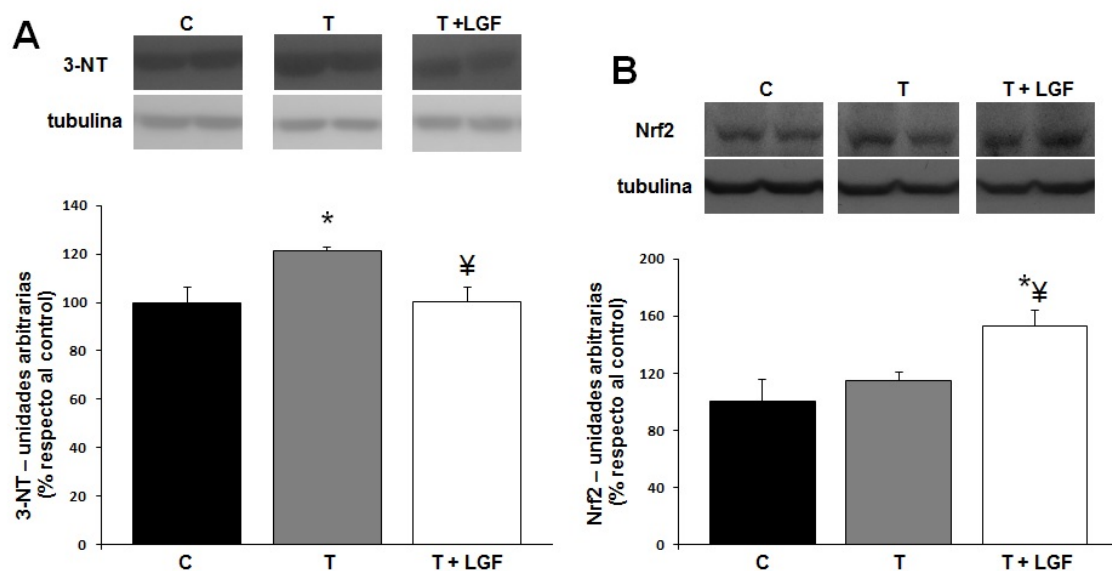


Figura 12. Niveles de 3-NT y Nrf2 en tejido pulmonar. Los resultados se muestran en % respecto al grupo control, al cual se le asignó un valor del 100%. Los datos fueron normalizados con tubulina (n = 5 por grupo). Los datos se muestran como la media ± EEM. * = p < 0,05 grupo control vs grupo tabaco; ¥ = p < 0,05 grupo tabaco vs grupo tabaco + LGF.

Discusión

En este trabajo, hemos estudiado el efecto del tratamiento con LGF sobre ratones con daño pulmonar previamente inducido mediante exposición crónica al humo de tabaco. El interés por comprobar cuáles pueden ser los efectos del LGF en nuestro modelo animal reside en el hecho de que en trabajos previos se ha demostrado el efecto positivo del LGF en otros modelos de enfermedades. Dentro de este marco, comprobar si el LGF activa procesos de reparación tisular en el tejido pulmonar dañado, serviría para esclarecer las incógnitas que actualmente existen sobre la posibilidad de revertir el enfisema, hecho que a día de hoy no se ha conseguido con los tratamientos desarrollados hasta el momento.

Para poder llevar a cabo este estudio, fue necesario establecer un modelo animal con enfisema inducido. Para ello constituimos un grupo de ratones que fueron expuestos al humo de tabaco durante un periodo de 6 meses y otro grupo que fue expuesto simplemente a aire ambiental para ser utilizado como control. Al finalizar el periodo de exposición, parte de los ratones fueron tratados con LGF durante las dos semanas siguientes constituyendo el grupo tabaco + LGF. Los ratones del grupo tabaco desarrollaron enfisema determinado mediante la observación de un agrandamiento significativo de los espacios alveolares y pérdida también de función pulmonar. Sin embargo, en los ratones del grupo tabaco + LGF no observamos diferencias ni en la arquitectura ni en la función pulmonar con respecto al grupo control inicial. Además, las alteraciones observadas en los ratones expuestos al humo de tabaco, correlacionaron con un aumento de la actividad de las MMPs y de la expresión de 3-NT, así como con un descenso en los niveles de VEGF en relación al grupo control. Por el contrario, en aquellos ratones del grupo tabaco que fueron tratados después con LGF, observamos un descenso de la actividad de las MMPs y de los niveles de 3-NT, así como un incremento de los niveles de PCNA, VEGF y Nrf2 que a continuación se discuten. Por lo tanto, nuestro estudio destaca que la administración de LGF en animales con enfisema inducido supone una recuperación sustancial del daño generado en los pulmones.

1. MODELO DE ENFISEMA PULMONAR

El desarrollo de la EPOC está condicionado por múltiples factores. Por este motivo, se han desarrollado diversos modelos para intentar imitar el perfil patofisiológico de la enfermedad. En los modelos de enfisema inducido por elastasa o LPS, se desencadena una respuesta inflamatoria rápida e intensa, la cual se resuelve en un periodo corto de tiempo. Además, la administración de LPS de forma continuada, deriva en el desarrollo de tolerancia inmunológica (12). En este aspecto, ambos modelos no reflejan correctamente el carácter progresivo y lento de la respuesta inflamatoria que tiene lugar en el desarrollo de la EPOC (8, 41). Por el contrario, la ventaja que tiene nuestro modelo de enfisema reside en que utilizamos el humo de tabaco, considerado el principal agente causante de la enfermedad. De este modo, la exposición al humo de tabaco promueve el desarrollo progresivo de enfisema con carácter leve como constatamos después mediante los estudios morfométricos.

La pérdida de peso es un fenómeno que suele manifestarse en personas con EPOC. En un estudio llevado a cabo con ratones C57BL/6j (49), se observó que la ganancia de peso fue más atenuada en aquellos ratones que fueron expuestos al humo de tabaco con respecto al grupo control. Siguiendo la misma línea, nuestros resultados reflejan datos similares en cuanto a la ganancia de peso, la cual se ve alterada a partir del tercer mes de exposición al humo de tabaco mientras que en el grupo control no se observa ninguna anomalía al respecto. Resultados similares fueron publicados en un estudio llevado a cabo por nuestro grupo en colaboración con la Dra. Barreiro (4), en el que ratones expuestos al humo de tabaco dejaron de ganar peso también al tercer mes, permaneciendo estable hasta el final del periodo de exposición. En este sentido, podemos confirmar que en este estudio, el humo de tabaco ejerció acción dañina en los ratones expuestos, y como consecuencia, éstos presentaron alteraciones en la ganancia de peso como ocurre en ciertas personas diagnosticadas con EPOC.

2. RECUPERACIÓN DEL DAÑO PULMONAR

Durante años, muchos han sido los trabajos que se han centrado en el estudio de diversos agentes terapéuticos con el objetivo de revertir el perfil enfisematoso en modelos de EPOC. Uno de ellos fue el ácido retinoico, cuya administración en ratas con enfisema inducido por elastasa instilada, promovía la recuperación de la lesión pulmonar (82), aunque los resultados no llegaron a ser confirmados en otros modelos (45). En nuestro grupo, en un estudio previo se analizaron los efectos de otro posible agente terapéutico como es la N-acetilcisteína (NAC), cuya administración en ratas expuestas al humo de tabaco, inducía una mejora de las alteraciones morfológicas y se corregían problemas en la distribución de la ventilación pulmonar (112). Más recientemente, el empleo de factores de crecimiento ha surgido como una nueva estrategia para desarrollar posibles tratamientos contra la EPOC (23). Por ejemplo, la administración de KGF en ratones con enfisema inducido por elastasa pareció reducir el agrandamiento de los espacios alveolares en ratones C57BL/6j (101). Del mismo modo pero siguiendo una estrategia diferente, el HGF indujo una mejoría de las alteraciones enfisematosas en ratas transgénicas que sobre-expresaban el gen que codifica para HGF (117). De forma similar, en este estudio hemos administrado otro factor de crecimiento en ratones con enfisema experimental, en este caso el LGF, y los resultados evidenciaron mejorías tanto a nivel morfológico como a nivel funcional.

3. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL LGF

3.1. Balance proteasa-antiproteasa

La liberación de MMPs y otras proteasas al medio, surge como una respuesta al daño tisular que se produce en los pulmones (129). Esta respuesta, en situaciones normales, es controlada y regulada por la liberación al mismo tiempo de inhibidores de

proteasas (TIMPs). Sin embargo, en un contexto patológico como el enfisema, este equilibrio se pierde de manera que la activación descontrolada de MMPs va a contribuir a la degradación de la matriz extracelular. Ejemplo de ello es que en varios estudios se ha demostrado que en personas con enfisema, los niveles de MMPs son mayores (42, 89). En cuanto a estudios con modelos animales, se ha descrito también la implicación que puede tener la MMP-12 en el desarrollo de enfisema en estos modelos, aunque su implicación en el desarrollo de enfisema en humanos no parece ser tan evidente. Al igual que esos estudios previos, nuestros resultados obtenidos *in vivo* mediante técnicas de imagen, confirman que en los ratones expuestos al humo de tabaco de forma crónica, existe un incremento de la actividad metaloproteásica, la cual desciende cuando los ratones expuestos al humo de tabaco son tratados posteriormente con LGF. La aplicación de técnicas de imagen para la detección de la actividad de las MMPs *in vivo* ya fue aplicada anteriormente en otro estudio realizado por nuestro grupo en otro modelo de daño pulmonar (97). Por lo tanto demostramos que ésta técnica es una herramienta muy útil para hacer un seguimiento de la actividad metaloproteásica a lo largo del tiempo, permitiendo así evaluar el daño pulmonar en tiempo real.

Por otro lado, los resultados de la PCRq muestran que en los ratones expuestos al humo de tabaco y tratados con LGF, hubo un descenso en la expresión del gen de la MMP-9 con respecto al grupo tabaco que no recibió tratamiento y que al mismo tiempo hubo un incremento de la expresión de TIMP-1 y TIMP-2. Sin embargo, no vimos diferencias en relación a la expresión del gen de la MMP-2. Por lo tanto, creemos que en este estudio, la administración de LGF promueve una mayor expresión de los inhibidores TIMP-1 y TIMP-2, así como el descenso de la expresión de la MMP-9 y la MMP-12 favoreciendo el descenso de la actividad metaloproteásica que vemos en el grupo tabaco + LGF. Sin embargo, desconocemos el mecanismo mediante el cual, el LGF induce un incremento de la expresión de los TIMPs y un descenso en la expresión de las MMPs que pueda conducir a la regulación de la actividad metaloproteásica.

La MMP-12 parece tener un rol importante en los modelos animales de enfisema (52), pero en nuestro caso no pudimos evaluar su actividad debido a que la

sonda MMPsense™680 no es activable por la MMP-12. En este sentido, tuvimos que analizar sus niveles en el tejido pulmonar mediante western-blot y observamos que en los ratones expuestos al humo de tabaco que recibieron tratamiento con LGF, los niveles eran menores con respecto al grupo de ratones expuestos al humo de tabaco que no recibieron tratamiento. Además las relaciones MMP-12/TIMP-1 y MMP-12/TIMP-2 también estaban disminuidas. Por lo tanto, nuestros resultados corroboran los datos previos publicados en otros estudios en relación a la implicación de la MMP-12 en el desarrollo de enfisema (52).

3.2 Apoptosis y proliferación

La acción dañina que ejercen los miles de compuestos tóxicos presentes en el humo de tabaco, da lugar a la destrucción del epitelio alveolar y la red de capilares sanguíneos. En los pulmones de personas con EPOC se ha confirmado que hay un incremento de fenómenos apoptóticos que afectan tanto a los neumocitos del epitelio alveolar como a las células endoteliales, favoreciendo así el desarrollo de enfisema (3). Además, el incremento de fenómenos de muerte celular está relacionado a su vez con un descenso de la expresión de VEGF, el cual actúa como un agente mitógeno promoviendo la supervivencia y diferenciación de células del endotelio y del epitelio alveolar (14, 40). De hecho, en un estudio en ratas se comprobó que el bloqueo del receptor de VEGF promovía el agrandamiento de los espacios alveolares y los fenómenos de apoptosis (63). De forma similar, el bloqueo de la expresión génica de VEGF en los pulmones en un estudio con ratones, también indujo el agrandamiento de los espacios alveolares (128). Siguiendo la misma línea, nuestros resultados mostraron que la exposición de ratones al humo de tabaco también indujo un descenso de los niveles de VEGF en los pulmones, correlacionando este dato con los resultados morfológicos y funcionales. Además, cuando los ratones expuestos al humo de tabaco se trataron con LGF, observamos que los niveles de VEGF incrementaban alcanzando valores semejantes a los observados en el grupo control.

En estudios previos, se ha determinado que PCNA puede ser un marcador de la actividad del LGF. En este sentido, con respecto a los niveles de PCNA, en nuestro estudio hubo un incremento de éstos niveles en el tejido pulmonar de ratones del grupo tabaco tratados después con LGF. De hecho, varios estudios en los que se probó a administrar LGF en otros modelos animales de enfermedades, demostraron que los niveles de PCNA aumentan con el tratamiento resaltando sus propiedades mitogénicas (37, 48, 109). Además, se ha demostrado que el LGF es capaz de estimular la síntesis de VEGF (78) y de promover la proliferación de células endoteliales (19, 48).

Cuando un agente externo genera un daño sobre el epitelio alveolar, los neumocitos tipo 2 son capaces de proliferar y diferenciarse en neumocitos tipo 1 para reconstruir el epitelio y recuperar la funcionalidad (115). En nuestro estudio, observamos un mayor número de células PCNA⁺ en el entramado alveolar y la gran mayoría eran además neumocitos tipo 2. En este aspecto, la hipótesis que planteamos es que el LGF promueve la reparación del daño pulmonar mediante el aumento de la expresión de VEGF y la proliferación de neumocitos tipo 2.

3.3 Estrés oxidativo

La exposición al humo de tabaco, supone la inhalación de una gran cantidad de partículas tóxicas con una actividad oxidante importante. Además, las células inflamatorias reclutadas en el tejido dañado van a liberar también al exterior especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) contribuyendo al incremento de la carga oxidativa y nitrosativa en los pulmones (90). Un fenómeno frecuente cuando se dan estas circunstancias en un contexto patológico como es el desarrollo de enfisema, es la interacción de moléculas de óxido nítrico (NO) con aniones superóxido (O_2^-) dando lugar a la formación de peroxinitrito ($ONOO^-$), el cual puede inducir la oxidación de diversas lipoproteínas (actividad oxidante) y la nitración de residuos de tirosina presentes en muchas proteínas (actividad nitrante). Detectar los niveles de este radical libre es complicado, pero si es posible estimar los niveles de 3-nitrotirosina (3-NT)

como un marcador indirecto del estrés oxidativo y nitrosativo (133). En nuestro modelo animal de enfisema, los ratones expuestos al humo de tabaco presentaban niveles elevados de este residuo con respecto al grupo control. Estos resultados concuerdan con otro estudio donde se publicó que en ratones expuestos al humo de tabaco, los niveles de 3-NT eran mayores que en el grupo control y que a su vez correlacionaba negativamente con el estado de la función pulmonar (44). Incluso en personas con EPOC se ha visto que los niveles de 3-NT, así como el número de células 3-NT⁺ son mayores con respecto a individuos sanos (57). Sin embargo, en los ratones expuestos al humo de tabaco que fueron tratados con LGF, observamos que los niveles de 3-NT eran inferiores a los observados en los ratones que no recibieron tratamiento. De este modo creemos que la mejoría observada en el grupo tabaco + LGF se debe en parte al descenso de la carga oxidante.

Por otro lado, en relación a la respuesta antioxidante que se activa cuando aumenta el estrés oxidativo, observamos que en los ratones expuestos al humo de tabaco, los niveles de Nrf2, el cual es un factor de transcripción capaz de activar la expresión de la gran mayoría de genes implicados en la respuesta antioxidante, no aumentaban en respuesta al estrés oxidativo. La relevancia que tiene Nrf2 en el desarrollo de enfisema ha sido previamente descrita en un estudio en ratones donde el bloqueo de la expresión de Nrf2 dio lugar al desarrollo de enfisema de forma más temprana y más agresiva en comparación con el grupo control (107). También se ha descrito que en ratones Nrf2^{-/-} expuestos al humo de tabaco, hay un incremento en la expresión de elastasa neutrofílica (NE), por lo que Nrf2 podría ser importante no solo en la respuesta antioxidante, sino también en la regulación de la respuesta inflamatoria y el equilibrio proteasa-antiproteasa (58). En este sentido, cuando los ratones expuestos al grupo tabaco fueron tratados con LGF, observamos que los niveles de Nrf2 incrementaban con respecto al grupo que no recibió tratamiento. La capacidad del LGF como bloqueante de radicales libres favoreciendo la respuesta antioxidante ya ha sido descrita en otros trabajos. En nuestro estudio, de forma similar, el LGF contribuiría a la mejora del daño pulmonar mediante el descenso de la carga oxidante y promoviendo una mayor respuesta frente al estrés oxidativo.

Los mecanismos de acción mediante los cuales el LGF ejerce su actividad terapéutica son muy complejos debido a que el LGF puede actuar a distintos niveles y sobre diversas vías:

- El LGF puede inducir crecimiento celular en hepatocitos, células del músculo liso, células endoteliales, microglía, astrocitos y células madre entre otras (19, 37, 48, 121).
- En hígado, se ha visto que la actividad mitogénica del LGF depende de la estimulación transitoria a nivel local de TNF- α producido por células endoteliales (36).
- Los efectos antifibróticos del LGF, al menos en hígado, van ligados a la inactivación de células fibróticas (33).
- El LGF es un potente inhibidor de la actividad oxidante de radicales demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* (20).
- La administración de LGF, promueve la expresión de una amplia variedad de moléculas intermediarias como la esfingosina-1-fosfato (S1P) que promueve supervivencia celular en enfisema (30).

4. LIMITACIONES

A pesar del interés y el valor de los resultados obtenidos, este estudio presenta algunas limitaciones. En cuanto al modelo animal, hemos elegido la cepa C57BL6/j, la cual se ha descrito como una cepa susceptible al daño pulmonar por exposición al humo de tabaco (50). Sin embargo, hay que tener en cuenta que el empleo de animales para generar modelos de EPOC no deja de ser una aproximación limitada a lo

que de verdad ocurre en personas con EPOC, puesto que los daños inducidos en los animales no llegan a reflejar la verdadera complejidad de la enfermedad. En segundo lugar, para evaluar la calidad de la función pulmonar nos basamos en el parámetro V_{\max} , el cual aporta una idea aproximada de la calidad de la función pulmonar a pesar de que su valor corresponde a la distensibilidad estática a una presión concreta. En este aspecto, el estudio de otros parámetros complementarios, aportarían en conjunto, resultados más precisos y detallados acerca del estado de la función pulmonar. En tercer lugar, a pesar de que los resultados del estudio reflejan cambios sustanciales a nivel pulmonar por la administración de LGF en ratones previamente expuestos al humo de tabaco, los cuales correlacionaron con una mejora tanto de la arquitectura como de la función pulmonar, es importante destacar que los resultados recogen aspectos aislados de un proceso mucho más complejo. En este sentido, el desarrollo en un futuro de nuevos experimentos, servirá para profundizar con más detalle sobre los mecanismos de acción del LGF en los pulmones mediante los que promueve la reparación tisular.

Conclusiones

1. La administración de LGF en nuestro modelo de enfisema:
 - promueve la recuperación del daño pulmonar previamente inducido tanto a nivel morfométrico como a nivel funcional.
 - induce un descenso de la actividad de las MMPs y favorece la estimulación de TIMP-1 y TIMP-2 regulando el equilibrio proteasa-antiproteasa.
 - Estimula la reparación tisular mediante la expresión de VEGF y mediante la proliferación de los neumocitos tipo 2.
 - Favorece el descenso de la carga oxidante generada en los pulmones mediante la regulación de la respuesta antioxidante orquestada por Nrf2.
2. El efecto del LGF se produce sobre un modelo de enfermedad previamente establecida, despertando un gran interés como posible tratamiento de enfisema en un futuro.
3. La exposición de ratones al humo de tabaco durante 6 meses según nuestro protocolo, da lugar al desarrollo de un modelo de enfisema de forma eficaz y fiable para el estudio de esta patología.

Bibliografía

1. Abe S, Boyer C, Liu X, Wen FQ, Kobayashi T, Fang Q, et al. Cells derived from the circulation contribute to the repair of lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;170(11):1158-63.
2. Antón-Díaz E, Ruiz-López D, Ancochea J. Herencia y ambiente en la EPOC. *Arch Bronconeumol*. 2007;Supl 1:10-7.
3. Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A. Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2003;28(5):555-62.
4. Barreiro E, del Puerto-Nevado L, Puig-Vilanova E, Perez-Rial S, Sanchez F, Martinez-Galan L, et al. Cigarette smoke-induced oxidative stress in skeletal muscles of mice. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2012;182(1):9-17.
5. Bartalesi B, Cavarra E, Fineschi S, Lucattelli M, Lunghi B, Martorana PA, et al. Different lung responses to cigarette smoke in two strains of mice sensitive to oxidants. *The European respiratory journal*. 2005;25(1):15-22.
6. Becker CG, Dubin T. Activation of factor XII by tobacco glycoprotein. *The Journal of experimental medicine*. 1977;146(2):457-67.
7. Bellusci S, Henderson R, Winnier G, Oikawa T, Hogan BL. Evidence from normal expression and targeted misexpression that bone morphogenetic protein (Bmp-4) plays a role in mouse embryonic lung morphogenesis. *Development*. 1996;122(6):1693-702.
8. Birrell MA, Wong S, Hele DJ, McCluskie K, Hardaker E, Belvisi MG. Steroid-resistant inflammation in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease is associated with a lack of nuclear factor-kappaB pathway activation. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;172(1):74-84.
9. Bonay M, Boutten A, Lecon-Malas V, Marchal J, Soler P, Fournier M, et al. Hepatocyte and keratinocyte growth factors and their receptors in human lung emphysema. *BMC pulmonary medicine*. 2005;5:13.
10. Bostrom H, Willetts K, Pekny M, Leveen P, Lindahl P, Hedstrand H, et al. PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell*. 1996;85(6):863-73.
11. Boutten A, Goven D, Artaud-Macari E, Boczkowski J, Bonay M. NRF2 targeting: a promising therapeutic strategy in chronic obstructive pulmonary disease. *Trends in molecular medicine*. 2011;17(7):363-71.

12. Brass DM, Hollingsworth JW, Cinque M, Li Z, Potts E, Toloza E, et al. Chronic LPS inhalation causes emphysema-like changes in mouse lung that are associated with apoptosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2008;39(5):584-90.
13. Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002;3(3):207-14.
14. Brown KR, England KM, Goss KL, Snyder JM, Acarregui MJ. VEGF induces airway epithelial cell proliferation in human fetal lung in vitro. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2001;281(4):L1001-10.
15. Brusselle GG, Bracke KR, Maes T, D'Hulst A I, Moerloose KB, Joos GF, et al. Murine models of COPD. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2006;19(3):155-65.
16. Calabrese F, Giacometti C, Beghe B, Rea F, Loy M, Zuin R, et al. Marked alveolar apoptosis/proliferation imbalance in end-stage emphysema. *Respiratory research*. 2005;6:14.
17. Cardoso WV. Molecular regulation of lung development. *Annual review of physiology*. 2001;63:471-94.
18. Cavarra E, Bartalesi B, Lucattelli M, Fineschi S, Lunghi B, Gambelli F, et al. Effects of cigarette smoke in mice with different levels of alpha(1)-proteinase inhibitor and sensitivity to oxidants. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;164(5):886-90.
19. Conde MV, Gonzalez MC, Quintana-Villamandos B, Abderrahim F, Briones AM, Condezo-Hoyos L, et al. Liver growth factor treatment restores cell-extracellular matrix balance in resistance arteries and improves left ventricular hypertrophy in SHR. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2011;301(3):H1153-65.
20. Condezo-Hoyos L, Abderrahim F, Conde MV, Susin C, Diaz-Gil JJ, Gonzalez MC, et al. Antioxidant activity of liver growth factor, a bilirubin covalently bound to albumin. *Free radical biology & medicine*. 2009;46(5):656-62.
21. Condezo-Hoyos L, Arribas SM, Abderrahim F, Somoza B, Gil-Ortega M, Diaz-Gil JJ, et al. Liver growth factor treatment reverses vascular and plasmatic oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension*. 2012;30(6):1185-94.
22. Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine*. 2009;360(23):2445-54.

23. Crosby LM, Waters CM. Epithelial repair mechanisms in the lung. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2010;298(6):L715-31.
24. Crystal RG. Alpha 1-antitrypsin deficiency, emphysema, and liver disease. Genetic basis and strategies for therapy. *The Journal of clinical investigation*. 1990;85(5):1343-52.
25. Chakrabarti S, Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Experimental lung research*. 2005;31(6):599-621.
26. Chan K, Kan YW. Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(22):12731-6.
27. Churg A, Sin DD, Wright JL. Everything prevents emphysema: are animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease any use? *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2011;45(6):1111-5.
28. Churg A, Zhou S, Wright JL. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Matrix metalloproteinases in COPD. *The European respiratory journal*. 2012;39(1):197-209.
29. Desai TJ, Cardoso WV. Growth factors in lung development and disease: friends or foe? *Respiratory research*. 2002;3:2.
30. Diab KJ, Adamowicz JJ, Kamocki K, Rush NI, Garrison J, Gu Y, et al. Stimulation of sphingosine 1-phosphate signaling as an alveolar cell survival strategy in emphysema. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;181(4):344-52.
31. Diaz-Gil JJ, Escartin P, Garcia-Canero R, Trilla C, Veloso JJ, Sanchez G, et al. Purification of a liver DNA-synthesis promoter from plasma of partially hepatectomized rats. *Biochem J*. 1986;235(1):49-55.
32. Diaz-Gil JJ, Garcia-Monzon C, Rua C, Martin-Sanz P, Cereceda RM, Miquilena-Colina ME, et al. The anti-fibrotic effect of liver growth factor is associated with decreased intrahepatic levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 and transforming growth factor beta 1 in bile duct-ligated rats. *Histology and histopathology*. 2008;23(5):583-91.
33. Diaz-Gil JJ, Garcia-Monzon C, Rua C, Martin-Sanz P, Cereceda RM, Miquilena-Colina ME, et al. Liver growth factor antifibrotic activity in vivo is associated with a decrease in activation of hepatic stellate cells. *Histology and histopathology*. 2009;24(4):473-9.

34. Diaz-Gil JJ, Gavilanes JG, Garcia-Canero R, Garcia-Segura JM, Santamaria L, Trilla C, et al. Liver growth factor purified from human plasma is an albumin-bilirubin complex. *Molecular biology & medicine*. 1989;6(3):197-207.
35. Diaz-Gil JJ, Gavilanes JG, Sanchez G, Garcia-Canero R, Garcia-Segura JM, Santamaria L, et al. Identification of a liver growth factor as an albumin-bilirubin complex. *Biochem J*. 1987;243(2):443-8.
36. Diaz-Gil JJ, Majano PL, Lopez-Cabrera M, Sanchez-Lopez V, Rua C, Machin C, et al. The mitogenic activity of the liver growth factor is mediated by tumor necrosis factor alpha in rat liver. *J Hepatol*. 2003;38(5):598-604.
37. Diaz Gil JJ, Rua C, Machin C, Cereceda RM, Garcia-Canero R, de Foronda M, et al. Hepatic growth induced by injection of the liver growth factor into normal rats. *Growth regulation*. 1994;4(3):113-22.
38. Driscoll B, Buckley S, Bui KC, Anderson KD, Warburton D. Telomerase in alveolar epithelial development and repair. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2000;279(6):L1191-8.
39. Fehrenbach H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respiratory research*. 2001;2(1):33-46.
40. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004;25(4):581-611.
41. Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE, Trifilieff A. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol*. 2003;170(4):2106-12.
42. Finlay GA, Russell KJ, McMahon KJ, D'Arcy E M, Masterson JB, FitzGerald MX, et al. Elevated levels of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of emphysematous patients. *Thorax*. 1997;52(6):502-6.
43. Fischer BM, Pavlisko E, Voynow JA. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. 2011;6:413-21.
44. Foronjy RF, Mirochnitchenko O, Propokenko O, Lemaitre V, Jia Y, Inouye M, et al. Superoxide dismutase expression attenuates cigarette smoke- or elastase-generated emphysema in mice. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;173(6):623-31.
45. Fujita M, Ye Q, Ouchi H, Nakashima N, Hamada N, Hagimoto N, et al. Retinoic acid fails to reverse emphysema in adult mouse models. *Thorax*. 2004;59(3):224-30.

46. Glynos C, Dupont LL, Vassilakopoulos T, Papapetropoulos A, Brouckaert P, Giannis A, et al. The role of soluble guanylyl cyclase in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;188(7):789-99.
47. Gonzalo-Gobernado R, Calatrava-Ferreras L, Reimers D, Herranz AS, Rodriguez-Serrano M, Miranda C, et al. Neuroprotective activity of peripherally administered liver growth factor in a rat model of Parkinson's disease. *PloS one*. 2013;8(7):e67771.
48. Gonzalo-Gobernado R, Reimers D, Herranz AS, Diaz-Gil JJ, Osuna C, Asensio MJ, et al. Mobilization of neural stem cells and generation of new neurons in 6-OHDA-lesioned rats by intracerebroventricular infusion of liver growth factor. *J Histochem Cytochem*. 2009;57(5):491-502.
49. Gosker HR, Langen RC, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG, Steele C, et al. Extrapulmonary manifestations of chronic obstructive pulmonary disease in a mouse model of chronic cigarette smoke exposure. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2009;40(6):710-6.
50. Guerassimov A, Hoshino Y, Takubo Y, Turcotte A, Yamamoto M, Ghezzi H, et al. The development of emphysema in cigarette smoke-exposed mice is strain dependent. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;170(9):974-80.
51. Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *The European respiratory journal*. 2006;28(3):523-32.
52. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science*. 1997;277(5334):2002-4.
53. Hegab AE, Kubo H, Yamaya M, Asada M, He M, Fujino N, et al. Intranasal HGF administration ameliorates the physiologic and morphologic changes in lung emphysema. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2008;16(8):1417-26.
54. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine*. 2004;350(26):2645-53.
55. Hogg JC, Senior RM. Chronic obstructive pulmonary disease - part 2: pathology and biochemistry of emphysema. *Thorax*. 2002;57(9):830-4.

56. Huang Z, Wang Y, Nayak PS, Dammann CE, Sanchez-Esteban J. Stretch-induced fetal type II cell differentiation is mediated via ErbB1-ErbB4 interactions. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(22):18091-102.
57. Ichinose M, Sugiura H, Yamagata S, Koarai A, Shirato K. Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000;162(2 Pt 1):701-6.
58. Iizuka T, Ishii Y, Itoh K, Kiwamoto T, Kimura T, Matsuno Y, et al. Nrf2-deficient mice are highly susceptible to cigarette smoke-induced emphysema. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 2005;10(12):1113-25.
59. Ishizawa K, Kubo H, Yamada M, Kobayashi S, Numasaki M, Ueda S, et al. Bone marrow-derived cells contribute to lung regeneration after elastase-induced pulmonary emphysema. *FEBS letters*. 2004;556(1-3):249-52.
60. Ishizawa K, Kubo H, Yamada M, Kobayashi S, Suzuki T, Mizuno S, et al. Hepatocyte growth factor induces angiogenesis in injured lungs through mobilizing endothelial progenitor cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;324(1):276-80.
61. Janoff A. Proteases and lung injury. A state-of-the-art minireview. *Chest*. 1983;83(5 Suppl):54S-8S.
62. Kasahara Y, Tudor RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, Voelkel NF. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;163(3 Pt 1):737-44.
63. Kasahara Y, Tudor RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, et al. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(11):1311-9.
64. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2007;47:89-116.
65. Kirkham P, Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacology & therapeutics*. 2006;111(2):476-94.
66. Krieg AM, Vollmer J. Toll-like receptors 7, 8, and 9: linking innate immunity to autoimmunity. *Immunological reviews*. 2007;220:251-69.
67. Kyriazis A, Perez de Alejo R, Rodriguez I, Olsson LE, Ruiz-Cabello J. A MRI and polarized gases compatible respirator and gas administrator for the study of the

- small animal lung: volume measurement and control. *IEEE transactions on bio-medical engineering*. 2010;57(7):1745-9.
68. Laurell CB, Eriksson S. The electrophoretic alpha1-globulin pattern of serum in alpha1-antitrypsin deficiency. 1963. *Copd*. 2013;10 Suppl 1:3-8.
69. Leberl M, Kratzer A, Taraseviciene-Stewart L. Tobacco smoke induced COPD/emphysema in the animal model-are we all on the same page? *Frontiers in physiology*. 2013;4:91.
70. Lee J, Reddy R, Barsky L, Weinberg K, Driscoll B. Contribution of proliferation and DNA damage repair to alveolar epithelial type 2 cell recovery from hyperoxia. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2006;290(4):L685-L94.
71. Liebow AA. Pulmonary emphysema with special reference to vascular changes. *The American review of respiratory disease*. 1959;80(1, Part 2):67-93.
72. Lindahl P, Karlsson L, Hellstrom M, Gebre-Medhin S, Willetts K, Heath JK, et al. Alveogenesis failure in PDGF-A-deficient mice is coupled to lack of distal spreading of alveolar smooth muscle cell progenitors during lung development. *Development*. 1997;124(20):3943-53.
73. Liu C, Ikegami M, Stahlman MT, Dey CR, Whitsett JA. Inhibition of alveolarization and altered pulmonary mechanics in mice expressing GATA-6. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2003;285(6):L1246-54.
74. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol*. 2001;429(1-3):195-207.
75. Majo J, Ghezzi H, Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *The European respiratory journal*. 2001;17(5):946-53.
76. Mao JT, Goldin JG, Dermand J, Ibrahim G, Brown MS, Emerick A, et al. A pilot study of all-trans-retinoic acid for the treatment of human emphysema. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;165(5):718-23.
77. March TH, Barr EB, Finch GL, Hahn FF, Hobbs CH, Menache MG, et al. Cigarette smoke exposure produces more evidence of emphysema in B6C3F1 mice than in F344 rats. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 1999;51(2):289-99.
78. Martin-Hidalgo A, Arenas MI, Sacristan S, Huerta L, Diaz-Gil JJ, Carrillo E, et al. Rat testis localization of VEGFs and VEGF receptors in control and testicular regeneration stimulated by the liver growth factor (LGF). *Febs J*. 2007;274:F1-126, 296.

79. Martinez-Galan L, del Puerto-Nevado L, Perez-Rial S, Diaz-Gil JJ, Gonzalez-Mangado N, Peces-Barba G. Liver growth factor improves pulmonary fibrosis secondary to cadmium administration in rats. *Arch Bronconeumol*. 2010;46(1):20-6.
80. Marwick JA, Stevenson CS, Giddings J, MacNee W, Butler K, Rahman I, et al. Cigarette smoke disrupts VEGF165-VEGFR-2 receptor signaling complex in rat lungs and patients with COPD: morphological impact of VEGFR-2 inhibition. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2006;290(5):L897-908.
81. Mason RJ, Williams MC. Type II alveolar cell. Defender of the alveolus. *The American review of respiratory disease*. 1977;115(6 Pt 2):81-91.
82. Massaro GD, Massaro D. Retinoic acid treatment abrogates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Nature medicine*. 1997;3(6):675-7.
83. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS medicine*. 2006;3(11):e442.
84. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002;296(5566):301-5.
85. Mercer PF, Shute JK, Bhowmik A, Donaldson GC, Wedzicha JA, Warner JA. MMP-9, TIMP-1 and inflammatory cells in sputum from COPD patients during exacerbation. *Respiratory research*. 2005;6:151.
86. Meshi B, Vitalis TZ, Ionescu D, Elliott WM, Liu C, Wang XD, et al. Emphysematous lung destruction by cigarette smoke. The effects of latent adenoviral infection on the lung inflammatory response. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2002;26(1):52-7.
87. Miravittles M, de la Roza C, Morera J, Montemayor T, Gobartt E, Martin A, et al. Chronic respiratory symptoms, spirometry and knowledge of COPD among general population. *Respiratory medicine*. 2006;100(11):1973-80.
88. Miravittles M, Soler-Cataluna JJ, Calle M, Molina J, Almagro P, Quintano JA, et al. Spanish guideline for COPD (GesEPOC). Update 2014. *Arch Bronconeumol*. 2014;50 Suppl 1:1-16.
89. Molet S, Belleguic C, Lena H, Germain N, Bertrand CP, Shapiro SD, et al. Increase in macrophage elastase (MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2005;54(1):31-6.

90. Morissette MC, Parent J, Milot J. Alveolar epithelial and endothelial cell apoptosis in emphysema: what we know and what we need to know. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. 2009;4:19-31.
91. Ng YS, Rohan R, Sunday ME, Demello DE, D'Amore PA. Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2001;220(2):112-21.
92. Ohmichi H, Matsumoto K, Nakamura T. In vivo mitogenic action of HGF on lung epithelial cells: pulmotrophic role in lung regeneration. *The American journal of physiology*. 1996;270(6 Pt 1):L1031-9.
93. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(14):8407-11.
94. Paiva SA, Godoy I, Vannucchi H, Favaro RM, Geraldo RR, Campana AO. Assessment of vitamin A status in chronic obstructive pulmonary disease patients and healthy smokers. *The American journal of clinical nutrition*. 1996;64(6):928-34.
95. Panos RJ, Bak PM, Simonet WS, Rubin JS, Smith LJ. Intratracheal instillation of keratinocyte growth factor decreases hyperoxia-induced mortality in rats. *The Journal of clinical investigation*. 1995;96(4):2026-33.
96. Perez-Crespo M, Pericuesta E, Perez-Cerezales S, Arenas MI, Lobo MV, Diaz-Gil JJ, et al. Effect of liver growth factor on both testicular regeneration and recovery of spermatogenesis in busulfan-treated mice. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9:21.
97. Perez-Rial S, Del Puerto-Nevado L, Gonzalez-Mangado N, Peces-Barba G. Early detection of susceptibility to acute lung inflammation by molecular imaging in mice exposed to cigarette smoke. *Molecular imaging*. 2011;10(5):398-405.
98. Perez-Rial S, del Puerto-Nevado L, Terron-Exposito R, Giron-Martinez A, Gonzalez-Mangado N, Peces-Barba G. Role of recently migrated monocytes in cigarette smoke-induced lung inflammation in different strain of mice. *PloS one*. 2013;8(9):e72975.
99. Petty TL. The history of COPD. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. 2006;1(1):3-14.
100. Phillips DH. Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues. *Carcinogenesis*. 2002;23(12):1979-2004.

101. Plantier L, Marchand-Adam S, Antico Arciuch VG, Boyer L, De Coster C, Marchal J, et al. Keratinocyte growth factor protects against elastase-induced pulmonary emphysema in mice. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2007;293(5):L1230-9.
102. Plantier L, Marchand-Adam S, Marchal-Somme J, Leseche G, Fournier M, Dehoux M, et al. Defect of hepatocyte growth factor production by fibroblasts in human pulmonary emphysema. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2005;288(4):L641-7.
103. Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;686:12-27; discussion - 8.
104. Rahman I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *The European respiratory journal*. 2006;28(1):219-42.
105. Rahman I, MacNee W. Oxidant/antioxidant imbalance in smokers and chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 1996;51(4):348-50.
106. Rahman I, MacNee W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax*. 1998;53(7):601-12.
107. Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, Zhen L, Srisuma SS, Kensler TW, et al. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(9):1248-59.
108. Reddy R, Buckley S, Doerken M, Barsky L, Weinberg K, Anderson KD, et al. Isolation of a putative progenitor subpopulation of alveolar epithelial type 2 cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2004;286(4):L658-67.
109. Reimers D, Herranz AS, Diaz-Gil JJ, Lobo MV, Paino CL, Alonso R, et al. Intrastriatal infusion of liver growth factor stimulates dopamine terminal sprouting and partially restores motor function in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Histochem Cytochem*. 2006;54(4):457-65.
110. Reimers D, Osuna C, Gonzalo-Gobernado R, Herranz AS, Diaz-Gil JJ, Jimenez-Escrig A, et al. Liver growth factor promotes the survival of grafted neural stem cells in a rat model of Parkinson's disease. *Current stem cell research & therapy*. 2012;7(1):15-25.
111. Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Sciurba FC, et al. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;164(3):469-73.

112. Rubio ML, Sanchez-Cifuentes MV, Ortega M, Peces-Barba G, Escolar JD, Verbanck S, et al. N-acetylcysteine prevents cigarette smoke induced small airways alterations in rats. *The European respiratory journal*. 2000;15(3):505-11.
113. Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, et al. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2002;26(5):602-9.
114. Seifart C, Muyal JP, Plagens A, Yildirim AO, Kohse K, Grau V, et al. All-trans retinoic acid results in irregular repair of septa and fails to inhibit proinflammatory macrophages. *The European respiratory journal*. 2011;38(2):425-39.
115. Serrano-Mollar A, Nacher M, Gay-Jordi G, Closa D, Xaubet A, Bulbena O. Intratracheal transplantation of alveolar type II cells reverses bleomycin-induced lung fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007;176(12):1261-8.
116. Shapiro SD. Animal models for chronic obstructive pulmonary disease: age of klothe and marlboro mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2000;22(1):4-7.
117. Shigemura N, Sawa Y, Mizuno S, Ono M, Ohta M, Nakamura T, et al. Amelioration of pulmonary emphysema by in vivo gene transfection with hepatocyte growth factor in rats. *Circulation*. 2005;111(11):1407-14.
118. Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Current opinion in immunology*. 1998;10(5):581-7.
119. Siegelman MH, DeGrendele HC, Estess P. Activation and interaction of CD44 and hyaluronan in immunological systems. *Journal of leukocyte biology*. 1999;66(2):315-21.
120. Snider GL, Lucey EC, Stone PJ. Animal models of emphysema. *The American review of respiratory disease*. 1986;133(1):149-69.
121. Somoza B, Abderrahim F, Gonzalez JM, Conde MV, Arribas SM, Starcher B, et al. Short-term treatment of spontaneously hypertensive rats with liver growth factor reduces carotid artery fibrosis, improves vascular function, and lowers blood pressure. *Cardiovascular research*. 2006;69(3):764-71.
122. Soriano JB, Miravittles M. Datos epidemiológicos de EPOC en España. *Arch Bronconeumol*. 2007;43(Supl 1):2-9.

123. Soriano JB, Miravittles M, Borderías L, duran-Tauleria E, Garcia Rio F, Martinez J, et al. Diferencias geográficas en la prevalencia de EPOC en España: relación con hábito tabáquico, tasas de mortalidad y otros determinantes. *Arch Bronconeumol*. 2010;46(10):522-30.
124. Stevenson CS, Docx C, Webster R, Battram C, Hynx D, Giddings J, et al. Comprehensive gene expression profiling of rat lung reveals distinct acute and chronic responses to cigarette smoke inhalation. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2007;293(5):L1183-93.
125. Stocks J, Hislop A, Sonnappa S. Early lung development: lifelong effect on respiratory health and disease. *The lancet Respiratory medicine*. 2013;1(9):728-42.
126. Surra JC, Guillen N, Barranquero C, Arbones-Mainar JM, Navarro MA, Gascon S, et al. Sex-dependent effect of liver growth factor on atherosclerotic lesions and fatty liver disease in apolipoprotein E knockout mice. *Histology and histopathology*. 2010;25(5):609-18.
127. Takahashi S, Nakamura H, Seki M, Shiraishi Y, Yamamoto M, Furuuchi M, et al. Reversal of elastase-induced pulmonary emphysema and promotion of alveolar epithelial cell proliferation by simvastatin in mice. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2008;294(5):L882-90.
128. Tang K, Rossiter HB, Wagner PD, Breen EC. Lung-targeted VEGF inactivation leads to an emphysema phenotype in mice. *J Appl Physiol*. 2004;97(4):1559-66; discussion 49.
129. Tetley TD. Inflammatory cells and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4(6):607-18.
130. Tudor RM, Zhen L, Cho CY, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Salvemini D, et al. Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2003;29(1):88-97.
131. Ulich TR, Yi ES, Longmuir K, Yin S, Biltz R, Morris CF, et al. Keratinocyte growth factor is a growth factor for type II pneumocytes in vivo. *The Journal of clinical investigation*. 1994;93(3):1298-306.
132. van der Strate BW, Postma DS, Brandsma CA, Melgert BN, Luinge MA, Geerlings M, et al. Cigarette smoke-induced emphysema: A role for the B cell? *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;173(7):751-8.
133. van der Vliet A, Eiserich JP, Shigenaga MK, Cross CE. Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract: epiphenomena or a pathobiologic

- mechanism of disease? American journal of respiratory and critical care medicine. 1999;160(1):1-9.
134. Van Lint P, Libert C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. Journal of leukocyte biology. 2007;82(6):1375-81.
 135. Wang D, Haviland DL, Burns AR, Zsigmond E, Wetsel RA. A pure population of lung alveolar epithelial type II cells derived from human embryonic stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007;104(11):4449-54.
 136. Warburton D, Schwarz M, Tefft D, Flores-Delgado G, Anderson KD, Cardoso WV. The molecular basis of lung morphogenesis. Mechanisms of development. 2000;92(1):55-81.
 137. Warren CP. The nature and causes of chronic obstructive pulmonary disease: a historical perspective. The Christie Lecture 2007, Chicago, USA. Canadian respiratory journal : journal of the Canadian Thoracic Society. 2009;16(1):13-20.
 138. Weissmann N, Lobo B, Pichl A, Parajuli N, Seimetz M, Puig-Pey R, et al. Stimulation of soluble guanylate cyclase prevents cigarette smoke-induced pulmonary hypertension and emphysema. American journal of respiratory and critical care medicine. 2014.
 139. Wright JL, Churg A. Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig. The American review of respiratory disease. 1990;142(6 Pt 1):1422-8.
 140. Wright JL, Churg A. A model of tobacco smoke-induced airflow obstruction in the guinea pig. Chest. 2002;121(5 Suppl):188S-91S.
 141. Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A, Respiratory Failure Research Group in J. Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. Chest. 2004;125(2):626-32.
 142. Yoshida T, Tudor RM. Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. Physiological reviews. 2007;87(3):1047-82.

Publicaciones
